

Aus dem Kaiserin Auguste Victoria Haus
Kinderklinik der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Helge

ZUR FRAGE DER OPTIMALEN AUFBEWAHRUNG VON MUTTERMILCH:
BAKTERIOLOGISCHE, IMMUNOLOGISCHE UND CYTOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Beate Kellndorfer
Burghausen/Altötting

Aus dem Kaiserin Auguste Victoria Haus
Kinderklinik der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Helge

ZUR FRAGE DER OPTIMALEN AUFBEWAHRUNG VON MUTTERMILCH:
BAKTERIOLOGISCHE, IMMUNOLOGISCHE UND CYTOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Beate Kellndorfer
Burghausen/Altötting

Referent: Professor Dr. med. L. Ballowitz

Korreferent: Professor Dr. med. V. Lenk

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität

Promoviert am: 16.11.1984

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	5
A. Vorteile der Muttermilchernährung	5
B. Historischer Rückblick	10
C. Auswirkungen der Hitzebehandlung auf Muttermilch bzw. Colostrum	13
II. Material und Methoden	16
A. Gewinnung von Colostrum und Muttermilch	16
B. Beimpfen der Milch	17
C. Aufbewahrung der Milchproben	17
D. Bestimmung des Zellgehaltes der Muttermilch	19
E. Bestimmung des Immunglobulingehaltes der Muttermilch	19
F. Bestimmung des Keimgehaltes der Muttermilch	20
G. Statistische Auswertung	22
III. Ergebnisse	23
A. Leukozyten	23
1. Leukozytengehalt der frischen Colostrum- und Muttermilchproben	23
2. Auswirkung verschiedener Lagerungsbe- dingungen auf die Leukozytenzahl der Milch	27
3. Verhalten der Leukozyten in mit E. coli beimpften Milchproben unter verschiedenen Lagerungsbedingungen	43
B. Immunglobuline	50
1. Immunglobulingehalt des frischen Colostrums bzw. der frischen Muttermilch	50
2. Auswirkungen verschiedener Lagerungs- bedingungen auf den Immunglobulingehalt der Muttermilch bzw. des Colostrums	53

	Seite
3. Verhalten des Immunglobulingehaltes in E. coli beimpfter Muttermilch unter verschiedenen Lagerungsbedingungen	62
C. Bakteriologische Untersuchungen	64
1. Bakterienflora der 42 unbehandelten frischen Colostrum- und Muttermilchproben	64
2. Verhalten der Bakterienzahl unter verschiedenen Lagerungsbedingungen	72
3. Auswirkung verschiedener Lagerungsbedin- gungen auf bakterielle Kontamination von Muttermilch	87
IV. Diskussion	92
V. Zusammenfassung	102
VI. Literaturverzeichnis	104
Literatur zum Historischen Teil	120

I. Einleitung

A. Vorteile der Muttermilchernährung

Die Abnahme der Stillfreudigkeit in den industrialisierten Ländern während der letzten 30 Jahre wird durch einen neuen Aufwärtstrend unterbrochen (54,96). Die Gründe für diesen Umschwung sind komplex, aber die Tendenz zu einer sich verstärkt an natürlichen Erfordernissen orientierenden Lebens- und Ernährungsweise, die verbesserte Aufklärung über den Nutzen der Muttermilch (MM) für das Kind sowie die Unterstützung durch bestimmte Laienorganisationen wie la Lèche League mögen wesentlich dazu beigetragen haben (13, 46, 86).

Auch die veränderte Situation in den Entbindungskliniken, wie das Einführen von "rooming in" beeinflusst sicherlich das Stillverhalten positiv (8, 82, 84, 94). Selbst die ernstzunehmende Diskussion um den Schadstoffgehalt der MM sollte vom medizinischen Standpunkt die Stillbereitschaft nicht beeinträchtigen (66).

Kinderärzte vertraten von jeher die Meinung, daß die optimale Ernährung des Neugeborenen und jungen Säuglings die an der Brust der eigenen Mutter getrunkene Milch ist. Dabei sind in der Frauenmilch und noch mehr im Colostrum die immunprotektiven Eigenschaften der Immunglobuline (sekretorisches IgA, IgG, IgM sowie IgE und IgD) und der lebenden Zellen von größter Wichtigkeit (25, 46, 50, 58, 67, 90, 95, 97, 103). Hinzu kommt die Schutzwirkung weiterer Eiweißbestandteile wie Lysozym, Lactoferrin, Lactoperoxidase, Antistaphylokokkenfaktor, Interferon, Komplement, Bifidusfaktor, Neuraminsäure, antivirale Aktivität usw. (15, 24, 33, 47, 50, 57, 67 - 70, 85, 90, 95, 97).

Der Erwerb einer solchen passiven Immunität spielt vor allem in den ersten Tagen nach der Geburt eine Rolle, da das Immunsystem des Neugeborenen noch nicht voll entwickelt ist. Aber auch in den folgenden Wochen bleiben brusternährte Kinder weniger anfällig gegenüber bestimmten Infektionen wie Gastroenteritis, E. coli-Enteritis, Salmonellenenteritis, Meningitis, Sepsis, Otitis media sowie respiratorischen Erkrankungen und nekrotisierender Enterocolitits (11, 18, 22, 26, 28, 38, 46, 49, 56, 63 - 65, 74, 80, 101).

In den Entwicklungsländern zeigen sich die Vorteile der Muttermilchernährung besonders eindrucksvoll in der deutlich geringeren Säuglingssterblichkeit natürlich ernährter Kinder im Vergleich zu künstlich ernährten (18, 64, 65). Ferner muß auch die antiallergische Wirkung der Frauenmilchernährung angesprochen werden: Durch das Vermeiden von Fremdproteinen in der Nahrung entsteht ein auch über die Stillzeit anhaltender Schutz gegen Allergien. Dies wird besonders aus Studien, die an Kindern aus Familien, in denen Kuhmilchallergien vorgekommen waren, deutlich (Matthew et al., 1977; Soothill 1980).

Auch im Hinblick auf die ernährungsphysiologische Zusammensetzung wird die MM von industriell hergestellten Präparaten nur annähernd erreicht. Dies gilt für alle in der MM vorkommenden Nährstoffe wie Eiweiß, Fett, Kohlenhydrate sowie für Vitamine und Mineralsalze, die sowohl qualitativ als auch quantitativ optimal auf die Bedürfnisse des Säuglings zugeschnitten sind. Bei MM-Ernährung treten metabolische Störungen wie Azotämie und metabolische Azidose seltener auf als bei künstlicher Ernährung (46, 80, 95). Außerdem kommt es bei gestillten Kindern nicht zu einer Überfütterung (80).

Aber nicht nur für das Kind hat das Stillen Vorteile, sondern auch für die Mutter. So trägt das Stillen zur schnelleren Rückbildung der Gebärmutter bei und das Körpergewicht kehrt schneller zur Norm zurück (8, 46). Auch aus psychologischer Sicht gibt es wichtige Argumente für das Stillen. So haben Untersuchungen von Klaus und Kennell (1970) gezeigt, daß Stillen die Herstellung einer engen Mutter-Kind-Beziehung fördert. Durch das Stillen wird das Bedürfnis des Neugeborenen nach Körperkontakt und Nähe zur Mutter auf ganz natürliche Weise erfüllt. Stillen leistet somit einen wesentlichen Beitrag zur Anpassung an das extrauterine Leben und zu einer gesunden psychischen Entwicklung. Auch der Wunsch der Mutter, das Kind zu berühren und anzusehen (en face position and eye to eye contact during breastfeeding), wird so befriedigt und die Haltung der Mutter gegenüber den Bedürfnissen des Kindes positiv beeinflusst (34, 46, 84). So haben Winberg et al. (1980) gezeigt, daß sehr frühes Anlegen innerhalb der ersten Stunde nach der Geburt die Bereitschaft der Mütter fördert, ihre Kinder zu stillen, was in einer Verlängerung der durchschnittlichen Stilldauer von 3 auf 6 Monate zum Ausdruck kommt (45, 100).

Es sei darauf verwiesen, daß vor allem für Frühgeborene die Ernährung mit MM, speziell mit Colostrum, von großem Vorteil ist (87). Dabei helfen die immunprotektiven Eigenschaften des frischen Colostrums, die Anpassung auch sehr kleiner und damit besonders infektionsgefährdeten Frühgeborener (Geburtsgewicht unter 1500 g) an das Leben außerhalb des Mutterleibes zu meistern (21, 44). Allerdings kann wegen eines hohen Proteinbedarfs eine vorübergehende Supplementierung der MM-Ernährung angezeigt sein, etwa solange, bis das Kind ein Körpergewicht über 1500 g erreicht hat (20, 21, 44, 102). Untersuchungen von Atkinson et al. (1978) deuten darauf hin, daß Mütter von Frühgeborenen längere Zeit Milch mit einem höheren Prote-

ingehalt und Immunglobulinspiegel produzieren als Mütter von reifgeborenen Kindern. Bei vorzeitigem Abbruch der Gravidität ist der Übergang vom Colostrum zur reifen Frauenmilch verzögert (5, 35, 36, 83).

Da Hitzebehandlung in jeder Form die antiinfektiösen Eigenschaften der MM mindert oder zerstört und ebenso den ernährungsphysiologischen Wert reduziert, was zu einem schlechteren Gedeihen Frühgeborener führen kann, sollte alles darangesetzt werden, den Frühgeborenen keimarme rohe Frauenmilch zu verabreichen. Williamson et al. (1978) zeigten, daß die mittlere Gewichtszunahme bei Kindern, die mit nativer MM ernährt wurden, größer war im Vergleich zu Kindern, die mit pasteurisierter MM ernährt wurden (99).

Wegen der deutlichen Vorteile der MM-Ernährung für die gesunde Entwicklung des Kindes sollte auch im Falle einer notwendigen Trennung von Mutter und Kind (z. B. bei einem Klinikaufenthalt des Säuglings) die Ernährung mit MM gewährleistet werden. Dazu müssen allerdings verschiedene Probleme gelöst werden: Vor allem muß die Stillwilligkeit der Mütter durch eine gute Aufklärung über den Nutzen der MM gefördert werden. Vielleicht hilft der Mutter dann auch das Wissen über den Vorteil der MM-Ernährung für ihr erkranktes Kind, den Schock der Trennung positiv zu überwinden, da ihr eine Möglichkeit gegeben wird, aktiv zur Genesung ihres Kindes beizutragen.

Wenn das Frühgeborene oder der kranke Säugling nicht aus eigener Kraft an der Brust der Mutter saugen kann, bzw. die Mutter nicht für jede Mahlzeit zur Verfügung steht, ist das Erlernen der Technik des Abpumpens wichtig. Die regelmäßige Milchproduktion muß aufrechterhalten oder auch erst in Gang gebracht werden. Später kann die Mutter, wenn das Kind zu Kräften gekommen

ist, die Ernährung direkt an der Brust fortsetzen. Für alle Techniken gilt es, die bakterielle Kontamination der Milch so gering wie nur möglich zu halten. Das beinhaltet eine vorher durchgeführte sorgfältige Reinigung von Händen und Brust und die Verwendung steriler Gefäße und Pumpen. Es gibt verschiedene Techniken zur Milchgewinnung. Dazu gehören das manuelle Ausstreichen und Auspressen der MM direkt in ein steriles Gefäß, die Verwendung einer Handpumpe oder einer elektrischen Brustpumpe. Von diesen Methoden erfüllt die erstgenannte am besten die bakteriologischen Ansprüche, wird aber oft als relativ mühsam empfunden (52). Eine weitere Möglichkeit stellt das Sammeln von "drip breast milk" dar, das von Gibbs et al. (1977) beschrieben wurde (30). Eine Kombination von Pumpe und Flasche in einem ist von der Fa. Kaneson^R (Japan) entwickelt worden (102). Sie wird als effektivste, angenehmste und bakteriologisch sicherste Brustpumpe beschrieben.

Ein weiteres Problem stellt der Transport und die Lagerung der MM zwischen Abnahme und Fütterung an den Säugling dar. Zwei Aspekte sind besonders zu berücksichtigen: Eine Vermehrung in der Milch vorhandener Keime während der Lagerungszeit soll vermieden werden. Gleichzeitig sollen die immunprotektiven und physiochemischen Eigenschaften der MM in möglichst hohem Maße gewahrt bleiben. Sie soll weitgehend der direkt an der Brust getrunkenen Milch entsprechen.

Lagerungsbedingungen zu finden, die beiden Ansprüchen gerecht werden, ist Thema der vorliegenden Arbeit. Sie folgt damit einem traditionellen Anliegen des Kaiserin Auguste Victoria Hauses in Berlin.

B. Historischer Rückblick¹⁾

Dieses Haus wurde 1909 aufgrund der damals sehr hohen Säuglingssterblichkeit (ca. 20 % der Neugeborenen erreichten nicht das erste Lebensjahr) (1, 2) als "Kaiserin Auguste Victoria Haus zur Bekämpfung der Säuglingssterblichkeit im Deutschen Reich - KAVH" gegründet. Es sollte eine "Zentralstelle für die gesamten Maßnahmen der Säuglingsfürsorge bilden" (E. Dietrich (1) S. 7), wobei der Erforschung des Zusammenhangs zwischen Ernährung und Säuglingssterblichkeit von vornherein besonderes Gewicht beigemessen wurde (2).

Die Vorteile der MM-Ernährung gegenüber künstlicher Ernährung wurden dabei frühzeitig z. B. durch wissenschaftliche Untersuchungen über die phagozytären Eigenschaften der Colostrumkörperchen (3), die Auswirkung der MM-Ernährung auf die Entwicklung eines gesunden Verdauungssystems des Säuglings (4) und Frühgeborenen (5) und den Nährwert von Colostrum (6, 7) bestätigt.

Die natürliche Ernährung galt als beste Prophylaxe gegen Verdauungs- und Ernährungsstörungen, gegen Azidose (22) und gegen Sepsis: "Die Frauenmilch bedeutet bei der Behandlung der Sepsis des jungen Säuglings eine *Conditio sine qua non*" (8). MM wurde auch bei Erkrankungen jenseits des Säuglingsalters mit großem Erfolg gegeben: "Es lassen sich so Kinder noch am Leben erhalten, bei denen durch keine künstliche Nährmethode der Tod abwendbar wäre" (L. Langstein (9)). Hinzu kamen statistische Erhebungen, die eine deutlich niedrigere Sterblichkeitsrate natürlich ernährter Säuglinge aufzeigten (11): "Die Sterblichkeit der Flaschenkinder ist siebenmal so groß wie die der Brustkinder" (10).

1) Die Literaturangaben zum historischen Teil befinden sich auf den Seiten 120-123

Ein zweites Hauptanliegen ergab sich gewissermaßen aus den Untersuchungen über den Wert der MM: Bemühungen, die Stillwilligkeit der Mütter zu fördern (12, 13). Dies wurde einerseits durch Aufklärungsschriften und Verteilung von Merkblätter zu erreichen versucht, die vom Standesbeamten jeder Person, die eine Geburt anmeldete, ausgehändigt wurden. In diesen Schriften wurden die Mütter über den Vorteil der natürlichen Ernährung für ihr Kind, über richtige Pflege und über die Wichtigkeit der Einhaltung hygienischer Bedingungen informiert (21). Mit den Worten "Eine Mutter, die ihr Kind stillen kann und es nicht tut, verdient nicht den Namen einer Mutter". verleiht L. Langstein der Wichtigkeit der natürlichen Ernährung besonderen Nachdruck (14).

In dem "Merkblatt für die Ernährung und Pflege des Säuglings und des Kleinkindes (bearbeitet im KAVH)" heißt es gleich zu Beginn: "Mutter, stille Dein Kind! Dies ist Deine heiligste Mutterpflicht. Du gibst damit Deinem Kinde die Grundlage zu seinem Gedeihen und die größte Widerstandsfähigkeit gegen krankhafte Störungen. Fast jede Mutter kann stillen, also wirst auch Du es können. Warte ruhig ab, wenn in den ersten Tagen nicht reichlich Milch vorhanden ist. Beharrlichkeit im Anlegen wird Dich fast immer zum Ziele führen."

Andererseits wurde stillenden Müttern vom Staate Unterstützung in Form von Geld oder Naturalien gewährt, die vor allem auch sozial schlechter gestellten Frauen zugute kommen sollte (15, 21, 23). F. Rott schreibt 1917: "Jedenfalls haben die Reichswochenhilfe und das Reichsstillgeld vermocht, die Frauen zum Stillen zu veranlassen, auch solche, die vorher nicht gestillt hatten." (16). Die Kenntnis der Bedeutung von MM für das Kind führte auch zur Auseinandersetzung mit der Frage, was zu tun

sei, falls die Mutter selbst ihr Kind nicht stillen könne. So wurden Studien angestellt, die sich mit dem Ammenwesen befassten. Hier standen Fragen, wann eine Amme hinzuzuziehen sei, welchen Anforderungen sie genügen müsse und welche Folgen die Tätigkeit als Amme sowohl für ihr Kind als auch für das Pflegekind haben könnte, im Vordergrund (14, 17, 18).

Auch das KAVH betrieb eine Ammenvermittlung, "deren Prinzip darin bestand, keine Mutter als Amme zu entlassen, die nicht mindestens 6 Wochen lang in der Anstalt ihr eigenes Kind gestillt hat und bei der die zweimalige Ausführung der Wassermann'schen Reaktion negativ ausgefallen ist. Aber wir verlangen auch von den Hausärzten jener Familie, die die Amme aufnimmt, ein ärztliches Zeugnis, daß das Stillkind frei von einer die Amme gefährdenden Krankheit ist. Die Ammenkinder bleiben, solange eine vollständige oder teilweise Ernährung mit Frauenmilch notwendig erscheint, in der Anstalt." (19). Außerdem konnte man im KAVH MM für kranke Säuglinge beziehen (11). Parallel dazu wurden Möglichkeiten untersucht, MM beispielsweise durch Kuhmilch oder Ziegenmilch zu ersetzen (20, 24). Neben Unterschieden im Nährwert wurde auch das Problem richtiger Lagerung, vor allem unter dem Gesichtspunkt der Keimarmut bei gleichzeitigem Erhalten des Nährwertes, angesprochen (1). Ein eigener Musterkuhstall im Anstaltsgelände sollte der Optimierung der Milchgewinnung und deren sachgemäßer Lagerung dienen und gleichzeitig Vorbild für ähnliche Einrichtungen sein (1). Inzwischen sind durch den technischen Fortschritt die Methoden zur temporären oder unbeschränkten Haltbarmachung von Kuhmilch weit fortgeschritten.

In erster Linie werden heute folgende Verfahrensweisen zur Haltbarmachung und Sterilisierung angewandt:

Pasteurisieren	(62,5° C	für 30 Minuten)
Kurzzeiterhitzen	(71-74° C	für 40 Sekunden)
Hocherhitzen	(85° C	für 10 Sekunden)
Kochen	(100° C)	
Ultrahocherhitzen (Uperisation)	(150° C	für 1-2 Sekunden) ¹⁾
Kondensieren	(Eindampfen im Vakuum auf die Hälfte oder ein Viertel der ursprünglichen Menge)	

Pasteurisieren und anschließendes Lyophilisieren

Es lag nahe, diese Methoden auch zur Gewinnung keimfreier Muttermilch und zu ihrer Konservierung heranzuziehen.

C. Auswirkungen der Hitzebehandlung auf Muttermilch bzw. Colostrum

Damit dem Säugling durch bakteriell verunreinigte MM kein Schaden zugefügt wird, hat man die MM in vielen Kliniken vor der Verabreichung an das Kind pasteurisiert oder gekocht. Man weiß jedoch, daß durch die Hitzebehandlung der MM deren anti-infektiöse Schutzwirkung verringert wird (98, 99). So fand man nach dem Pasteurisieren und Kochen eine völlige Zerstörung der in der MM vorhandenen Leukozyten (30, 51, 53, 60, 71, 92, 97). Der Immunglobulingehalt der MM wird ebenfalls reduziert. Der Gehalt an sekretorischem IgA nimmt beim Pasteurisieren um 20 - 30 % ab, IgG, IgM und IgE sind danach nicht mehr nachweisbar. Nach Erhitzen auf 100° C ist auch IgA nicht mehr nachzuweisen (30, 25, 27, 29, 51, 60, 71, 92, 97). Thermolabil

1) I. Berneff "Hygiene" Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1977,
S. 300

sind auch das Komplementsystem, (zerstört bei $62,5^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten), Lactoferrin (Reduktion um $2/3$ beim Pasteurisieren, vollständig bei 100°C), das Lactoperoxidasesystem und Lysozym (das bei Pasteurisieren kaum, beim Erhitzen auf 100°C fast ganz zerstört wird (15, 25, 27, 30, 60, 77, 97)).

Die bakteriostatische Wirkung roher MM auf bestimmte Keime wie *E. coli* und B-Streptokokken wird durch Pasteurisieren aufgehoben (30, 39, 51, 92) und macht die Milch anfälliger gegen spätere bakterielle Kontamination (30, 39). Neben den Nachteilen der Hitzebehandlung auf die immunprotektiven Eigenschaften der MM bewirkt Pasteurisieren eine geringere Fettabsorption aus dem Darm des Kindes. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Zerstörung der in der Milch vorkommenden Milchlipase (92, 99). Pasteurisieren reduziert die B_{12} -Bindungskapazität um 10 % (27,92). Abkochen zerstört die Folsäurebindungskapazität vollständig (92). Durch Hitzebehandlung der Milch wird auch die Konzentration einiger Vitamine (Vitamin C, Biotin, Thiamin) vermindert (27, 92). Aus dem Gesagten ist auch zu verstehen, daß die durch gramnegative Keime hervorgerufenen Dyspepsien durch gekochte MM kaum, dagegen mit roher MM sehr wohl positiv zu beeinflussen sind (38).

Allgemein kann man bei der Verwendung hitzebehandelter Frauenmilch feststellen, daß das Gedeihen der Kinder im Vergleich mit Kindern, die mit roher Frauenmilch ernährt werden, schlechter ist (10). Die geschilderten negativen Auswirkungen der Hitzebehandlung auf die Qualität der MM verdeutlichen nochmals die Notwendigkeit, nach Bedingungen zu suchen, unter denen MM möglichst keimarm gewonnen und aufbewahrt werden kann, ohne daß es zu einer Verminderung der immunprotektiven und ernährungsphysiologischen Eigenschaften kommt.

Aus den genannten Gründen wird dem Einfluß der Temperatur auf die Qualität der MM in der vorliegenden Arbeit besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Dies geschah auch im Hinblick auf die veränderten Bedingungen im Haushalt bzw. in Krankenhäusern (Kühlschränke mit Tiefkühlfach usw. stehen heutzutage im allgemeinen zur Verfügung), die eine Lagerung der Milch bei tieferen Temperaturen ohne weiteres praktikabel erscheinen lassen.

II. Material und Methoden

A. Gewinnung von Colostrum und Muttermilch

12 Colostrum- und 30 Muttermilchproben wurden von 42 gesunden Müttern (Alter zwischen 19 und 44 Jahren) gewonnen. Die Milch wurde mit einer Brustpumpe (Modell Atmolette, Fa. Attmos) durch einen sterilen Trichter direkt in dampf-sterilisierte Glasflaschen aufgenommen. Ein Teil der Milch stammte von Müttern, deren Kinder auf der Frühgeborenenstation oder der Neugeborenenstation des KAVH lagen. Die Colostrumproben wurden von Müttern auf der Entbindungsstation in der Frauenklinik der FU im Klinikum Charlottenburg gewonnen. Als Colostrum wird diejenige Milch bezeichnet, die zwischen dem ersten und dem vierten Tag nach der Geburt abgepumpt wurde und wobei eine tägliche Milchmenge von 100 g nicht überschritten wurde.

Die 42 Mütter stillten ihre Kinder oder pumpten regelmäßig ab. Es wurde nur Milch von Müttern untersucht, die keinerlei Anzeichen einer Mastitis zeigten und die keine Medikamente einnahmen. Die Muttermilchproben wurden jeweils zwischen zwei Stillmahlzeiten des Kindes gewonnen und stammten vom 1. bis 21. Tag nach der Geburt.

32 Milchproben wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen gewonnen: Die Mütter wuschen sich vor dem Abpumpen der Milch mit Wasser und Seife die Hände, reinigten anschließend die Brust mit aqua dest. und trockneten sie mit sterilen Kompressen ab. Die Milchprobe (5 - 20 ml) wurde in verschließbare Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (Fa. Greiner) abgefüllt und sofort ins bakteriologische Labor gebracht.

10 Proben wurden aus dem Kühlschrank der Klinik entnommen, wobei die Lagerungszeit maximal zwei Stunden betragen hatte. Erste bakteriologische, cytologische und immunologische Bestimmungen wurden innerhalb einer Stunde nach dem Gewinnen der Milch vorgenommen, weitere Proben wurden nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht.

B. Beimpfen der Milch

5 ml Peptonboullion wurden mit einer Kolonie E. coli des Stammes ATCC 25 922 beimpft und anschließend drei Stunden bei 37° C bebrütet. 20 ml dieser Suspension wurden in 20 ml einer isotonischen Kochsalzlösung verdünnt. Man erhielt eine Bakterien-suspension mit 10^4 - 10^5 Keimen/ml, die zur Beimpfung frischer Muttermilchproben diente. 10 ml Milch wurden mit 1 ml dieser Bakteriensuspension beimpft und wie unten beschrieben für die verschiedenen Untersuchungsgänge abgefüllt und gelagert.

C. Aufbewahrung der Milchproben

Beimpfte und unbeimpfte Milchproben wurden auf sterile Plastikröhrchen (Fa. Greiner) verteilt, so daß für jede, nach unterschiedlicher Lagerungsdauer, vorgenommenen Untersuchung zwei Röhrchen derselben Probe zur Verfügung standen. Ein Röhrchen enthielt 1 ml Milch (bzw. 0,5 ml Colostrum) für die zytologische Bestimmung, das andere Röhrchen enthielt eine ausreichende Menge für die bakteriologischen und immunologischen Untersuchungen.

Lagerungstemperaturen und Lagerungsdauer vor Durchführung der einzelnen Bestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1 Lagerungstemperaturen und Untersuchungszeiten
der 42 Milchproben

Lagerungs- temperaturen		Untersuchungszeit				
unbeimpfte	+ 4° C	24 h	48 h	72 h		
Milchproben	- 18° C	24 h	48 h	-	7 Tage	28 Tage
mit E. coli	+ 4° C	24 h	48 h	72 h		
beimpfte	- 18° C	24 h	-	-	7 Tage	

Bei allen Proben wurden pH-Bestimmungen vorgenommen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Zeiten wurden noch zu folgenden Zeiten Keimzahlbestimmungen durchgeführt:

1. aus frischer Milch nach 2 h Lagerung bei Raumtemperatur
2. aus 24 h tiefgefrorener Milch, die aufgetaut
 - a) 2 h bei Raumtemperatur
 - b) 24 h im Kühlschrank
 aufbewahrt wurde.

Für die Aufbewahrung der Milch bei + 4° C diente ein normaler Kühlschrank, für die Lagerung bei - 18° C ein Gefrierschrank.

D. Bestimmung des Zellgehaltes der Muttermilch

1 ml Milch (Colostrum 0,5 ml) wurde unter sterilen Bedingungen 1 : 3 mit physiologischem Phosphatpuffer (KH_2PO_4 / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) nach S Ø R E N S E N verdünnt und anschließend bei 250 upm 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Ecco-Superior - II - B, Fa. Medica Berlin).

Nach dem Zentrifugieren wurden drei Fraktionen erhalten: Zellniederschlag, klare Mittelschicht und die darüberliegende Fettschicht. Fett- und Mittelschicht wurden durch vorsichtiges Abpipettieren entfernt. Der Niederschlag wurde zweimal in 2 ml Phosphatpuffer gewaschen und dabei erneut zentrifugiert (2 x 15 min bei 250 μpm). Anschließend wurde der Überstand bis auf ein Volumen von 400 μl abpipettiert, die Zellen resuspendiert und mit 100 μl einer 1 %igen Trypanblau-Lösung versetzt (Fa. Merck). Nach einer Minute Färbezeit wurden die Leukozyten in einer Buerker-Tuerk-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt.

Die Zellvitalität wurde mit der Trypanblauausschlußmethode bestimmt. Als lebende Zellen wurden diejenigen bezeichnet, die den Farbstoff nicht aufnahmen. Die Zellzahl wurde in Zellen/ml Milch angegeben.

E. Bestimmung des Immunglobulingehaltes der Muttermilch

IgA, IgG und IgM-Konzentration wurden mittels radialer Immundiffusion unter Verwendung von Agarplatten, die bereits Antiserum gegen IgA, IgG und IgM enthielten bestimmt (Tripartigen^R - IgA und IgG, S - Partigen^R - IgM der Fa. Behring-Werke AG). Die Milch wurde unverdünnt aufgetragen. Die Ergebnisse wurden

entsprechend dem vom Hersteller angegebenen "Analyseverfahren B" ermittelt. Auf jede Platte wurden außer den zu untersuchenden Milchproben noch drei vom Hersteller gelieferte Standardseren bekannter Konzentration des jeweiligen Immunglobulins aufgetragen. Aus dem Durchmesser der sich daraus ergebenden Standardpräzipitate läßt sich eine Bezugskurve ermitteln, über die sich die Werte der zu untersuchenden Proben bestimmen lassen. Die Konzentration von IgG und IgM wird in mg/dl angegeben. Die IgA-Konzentration der Milch wurde aus demjenigen Durchmesser, der die stärkste Intensität aufwies ermittelt. Das Auftreten von zwei Präzipitatrungen beruht darauf, daß das Milch-IgA im Gegensatz zum Serum-IgA noch eine sekretorische Sequenz enthält. Die Konzentration von IgA wird ebenfalls in mg/dl angegeben, obwohl die auf Serum-IgA bezogene Umrechnung von willkürlichen Einheiten entsprechend der Definition der Behringwerke in mg/dl für die Milch nicht ganz zutreffend ist.

F. Bestimmung des Keimgehaltes der Muttermilch

a) Quantitativ: Keimzahlbestimmung erfolgte durch Plattenausspatelverfahren. Verwendet wurden Blutagarplatten der Fa. Biotest-Diagnostics (Frankfurt a. M.).

20 µl jeder Milchprobe wurden mittels geeichter Pipette auf die Platte aufgetragen, ausgespatelt und anschließend 24 Std. bei 37° C bebrütet. Am nächsten Tag wurden die einzelnen Kolonien gezählt.

Bei der beimpften Milch wurden zusätzlich Endoagarplatten (Fa. Biotest-Diagnostics) verwendet. Die Bakterienzahl wird als Keime/ml Milch angegeben.

b) Semiquantitativ: Verwendet wurde das Uricult-Verfahren (Fa. Boeringer-Mannheim), das auch als bakteriologischer Suchtest auf Harnwegsinfekte Anwendung findet. Der Nährbodenträger des Uricults ist auf der einen Seite mit Cled-Agar zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl versehen, die andere Seite besteht aus Mac-Conkey-Agar, der das Wachstum von grampositiven Keimen selektiv unterdrückt. Dabei gibt eine intensive Rotfärbung der Kolonie einen Hinweis auf *E. coli*.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der gleichzeitigen Bestimmung der Gesamtkeimzahl und der Zahl coliformer Keime. Beide Nährböden wurden vollständig mit Muttermilch benetzt, anschließend 24 h bei 37° C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit einer von der Herstellerfirma beigefügten Testkarte. Die Methode kann zur Bestimmung von Keimzahlen zwischen 10^3 und 10^7 /ml angewendet werden.

c) Qualitativ: Bei Auftreten gemischter Bakterienkulturen auf der Blutagarplatte bzw. bei Keimwachstum auf dem Mac-Conkey-Agar des Uricults wurden Einzelkolonien auf Endoagarplatten (Biotest) überimpft und die dann wachsenden gramnegativen Keime näher differenziert. Die Unterscheidung zwischen *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* erfolgte mit Hilfe des Koagulase-Tests.

F. Statistische Auswertung

An statistischen Verfahren wurden angewendet:

1. Friedman-Test zur Überprüfung des gemeinsamen Trends der einzelnen Proben unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen.
2. Histogramme der Differenzen vom log der Werte von frisch gewonnener Milch und der Werte der 72 h bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ gelagerten Milch bzw. der Werte der 28 Tage bei $- 18^{\circ}\text{C}$ gelagerten Milch.
3. Der Wilcoxon-Test zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen Lagerung im Kühlschrank und im Tiefkühlfach.

III. Ergebnisse

A. Leukozyten

1. Leukozytengehalt der frischen Colostrum- und Muttermilchproben

Die Leukozyten der Milch setzen sich im wesentlichen aus drei Haupttypen zusammen

- a) die neutrophilen Granulozyten, die eine beträchtliche Menge Fetttröpfchen phagozytiert haben und die weniger granuliert erscheinen als die neutrophilen Granulozyten des Blutes.
- b) die mononucleären Phagozyten, deren Größe von kleinen Zellen mit wenig Zytoplasma bis zu großen "schaumigen" Makrophagen variiert.
- c) immunkompetente B- und T-Lymphozyten, die in ihrem Aussehen denen des peripheren Blutes gleichen.

Neben den obengenannten Zellen konnte man gelegentlich noch Epithelzellen, die von der Hand oder der Brustwarze stammen, erkennen. Beim Zählen wurden alle unter a) bis c) genannten Zellen berücksichtigt, wobei sich die Gesamtleukozytenzahl aus den vitalen und nicht mehr vitalen Zellen zusammensetzt.

Die Gesamtleukozytenzahl der frischen Colostrum- und Muttermilchproben ist in Tabelle 2 aufgeführt. Die Tabelle enthält Mittelwerte und Standardabweichung sowie Variationsbreite der untersuchten Proben. Außerdem ist aus ihr der prozentuale Anteil der nicht vitalen Zellen zu entnehmen.

Tabelle 2 Mittlerer Leukozytengehalt der 12 frischen
Colostrum- und Muttermilchproben

Mittelwert (Zellen/ml)	Standard- abweichung	Variations- bereich	% tote Zellen (Mittelwert)
---------------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------------

Colostrum (12 Proben)

$4,0 \cdot 10^6$	$\pm 2,2 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6 - 9,6 \cdot 10^6$	$5,1 \pm 3,6$
------------------	----------------------	-----------------------------------	---------------

Muttermilch (30 Proben)

$9,6 \cdot 10^5$	$\pm 8,7 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5 - 3,9 \cdot 10^6$	$6,4 \pm 5,1$
------------------	----------------------	-----------------------------------	---------------

Die Colostrumproben enthielten signifikant höhere Zellzahlen ($p \leq 0,001$) als die untersuchten Muttermilchproben, wobei die individuellen Schwankungen hoch waren. Die hohe Variationsbreite ergab sich aus dem von Mutter zu Mutter sehr unterschiedlichen Milchfluß (die Colostrummenge variierte zwischen 10 g und 100 g/Tag, die Muttermilchmenge zwischen 80 und 500 g/Tag) und dem Zeitpunkt der Laktation, zu dem die Milchproben gewonnen wurden (Colostrumproben wurden vom 1. - 4. Tag, Muttermilchproben vom 5. - 21. Tag nach Laktationsbeginn gesammelt). Es zeigt sich, daß die Zellzahl mit größer werdender täglicher Milchmenge und mit zunehmender Laktationsdauer geringer wird (siehe Abbildung 1).

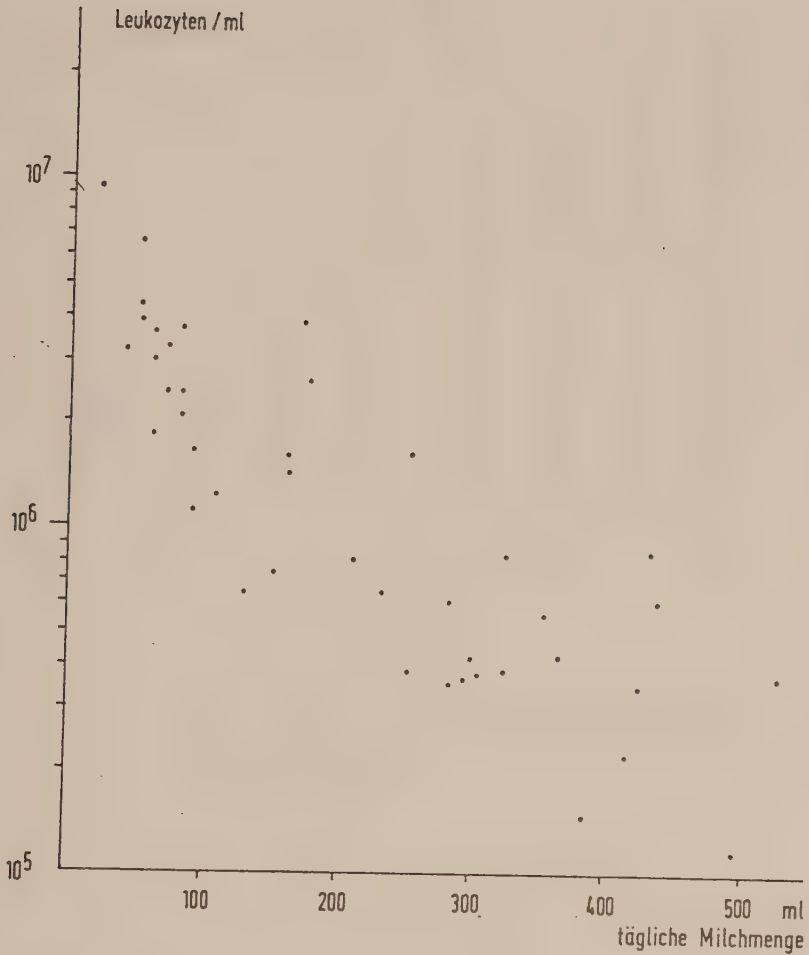


Abbildung 1 Leukozytenzahl/ml Milch in Abhängigkeit von der täglichen Milchmenge

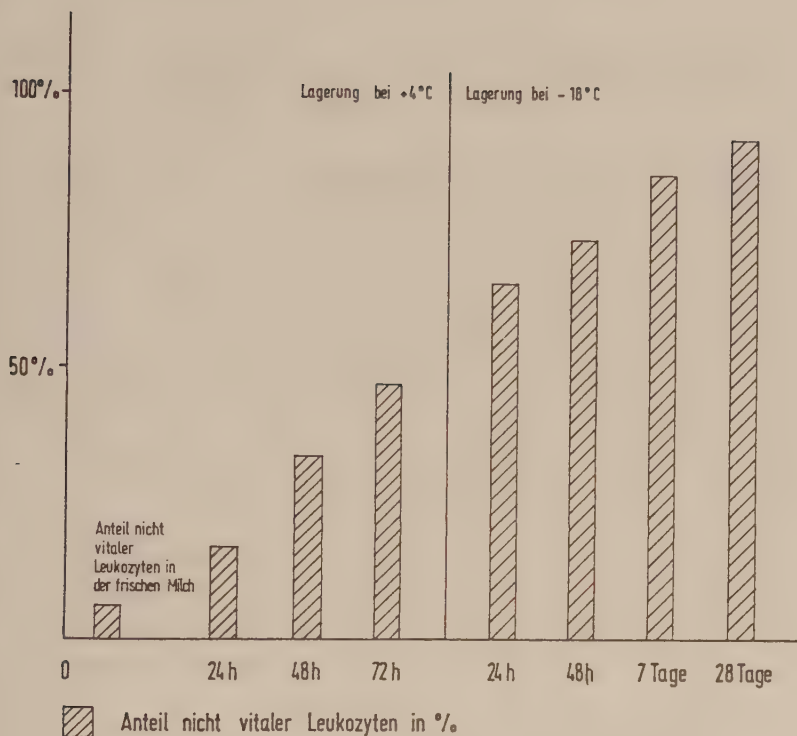


Abbildung 2 Anteil nicht vitaler Leukozyten in % an der Gesamtleukozytenzahl bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

2. Auswirkung verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Leukozytenzahl der Milch

Um den Einfluß von Lagerungsbedingungen auf die Leukozytenzahl der Milch zu untersuchen, wurden Milchproben bei $+4^{\circ}\text{C}$, entsprechend der normalen Kühlschranktemperatur, und bei -18°C , entsprechend der gängigen Tiefkühltemperatur, aufbewahrt. Zu unterschiedlichen Zeiten wurde die Gesamtzahl der Leukozyten bestimmt. Außerdem wurde das Verhältnis zwischen vitalen und toten Zellen ermittelt. Aus diesen beiden Werten ergibt sich die Zahl vitaler Leukozyten zu den verschiedenen Bestimmungszeitpunkten. Die Einzelwerte sind in den Abbildungen 3, 4, 5 a und 5 b graphisch dargestellt. Wie die Tabellen 3 a und 3 b, die die Mittelwerte der Gesamtleukozytenzahl aller Milchproben bzw. der 12 Colostrum- und 30 Muttermilchproben enthalten, zeigen, reduziert sich die Gesamtzahl der Leukozyten durch Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ um ungefähr den gleichen Faktor wie durch Lagerung bei -18°C .

Die in den Tabellen 4 a und 4 b unter 0 h aufgeführten durchschnittlichen Leukozytenzahlen ergeben sich aus den jeweils frisch gewonnenen Colostrum- bzw. Muttermilchproben. Auch findet die Reduktion in den Colostrum- und Muttermilchproben in etwa gleichem Maße statt. Betrachtet man jedoch die Auswirkung der Lagerungstemperatur auf das Verhältnis vitaler/nicht vitaler Zellen, so zeigt sich, daß Lagerung bei -18°C in erheblich stärkerem Maße zur Leukozyteninaktivierung führt als Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 4 und Abbildung 2 geben die Mittelwerte des prozentualen Anteils der toten Leukozyten unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen wieder.

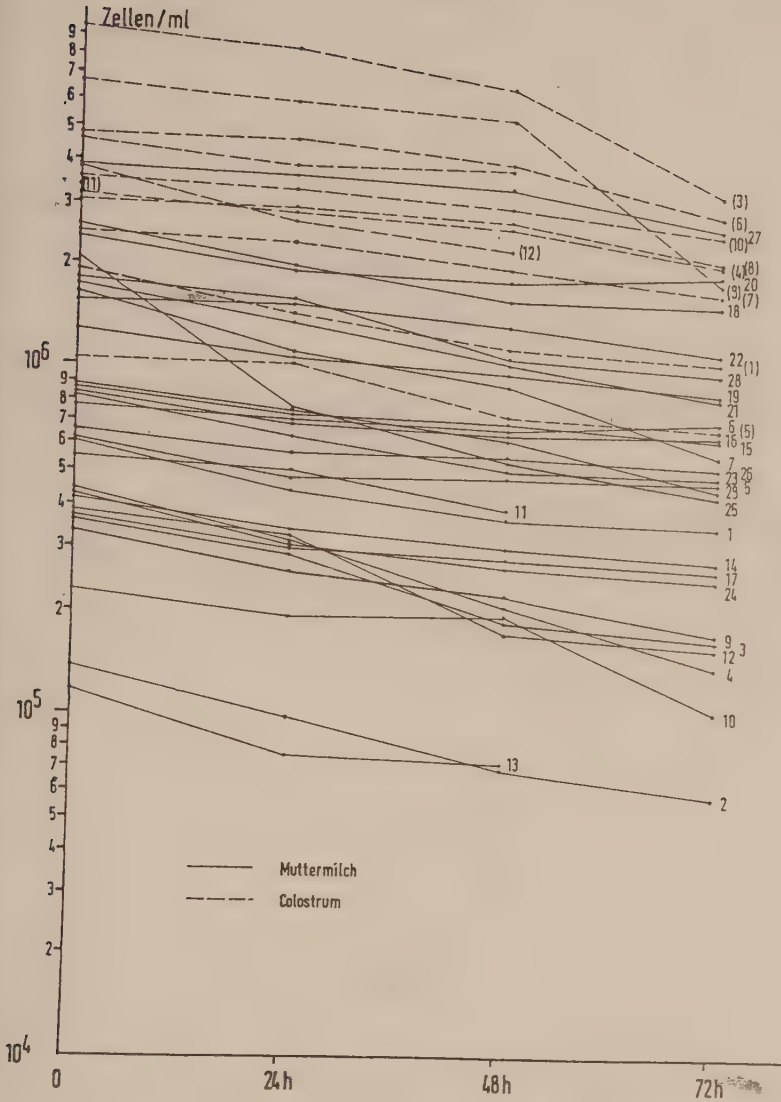


Abbildung 3 a Gesamtleukozytenzahl in den Colostrum- und Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen a) Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$

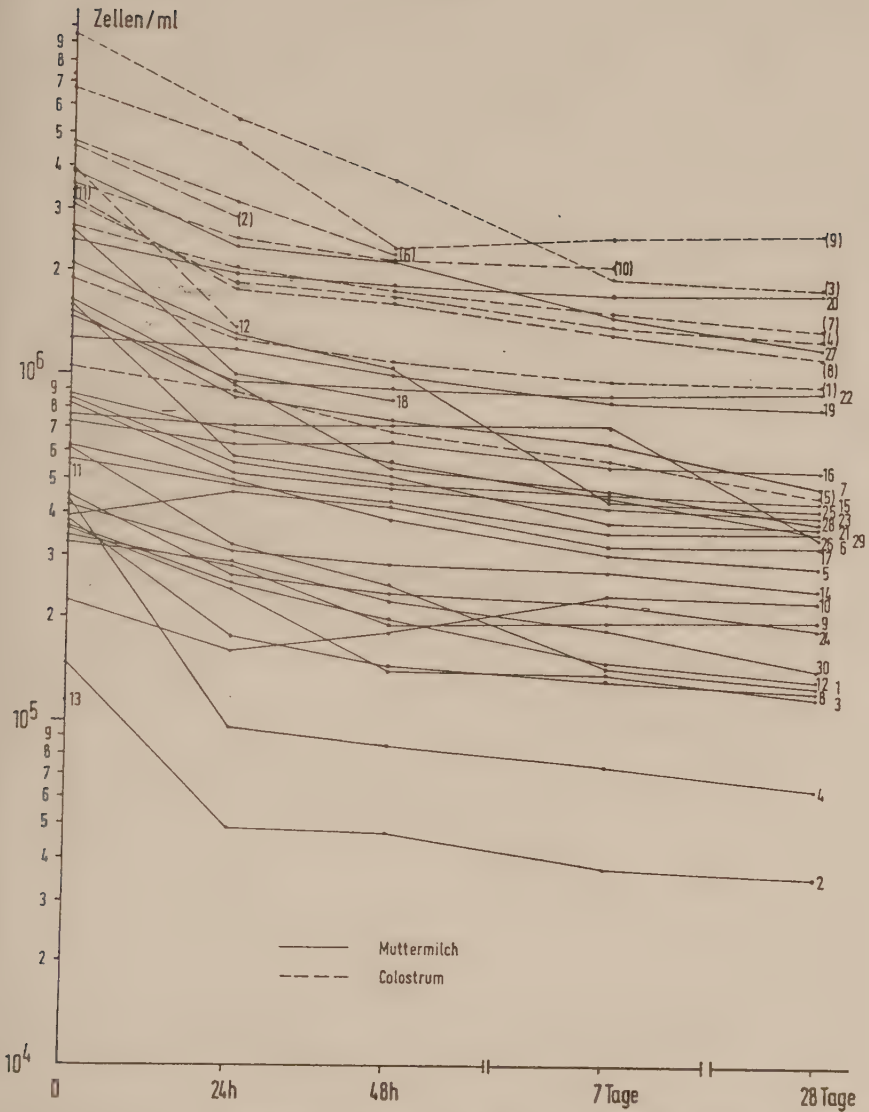


Abbildung 3 b Gesamtleukozytenzahl in den Colostrum- und Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen b) Lagerung bei -18°C

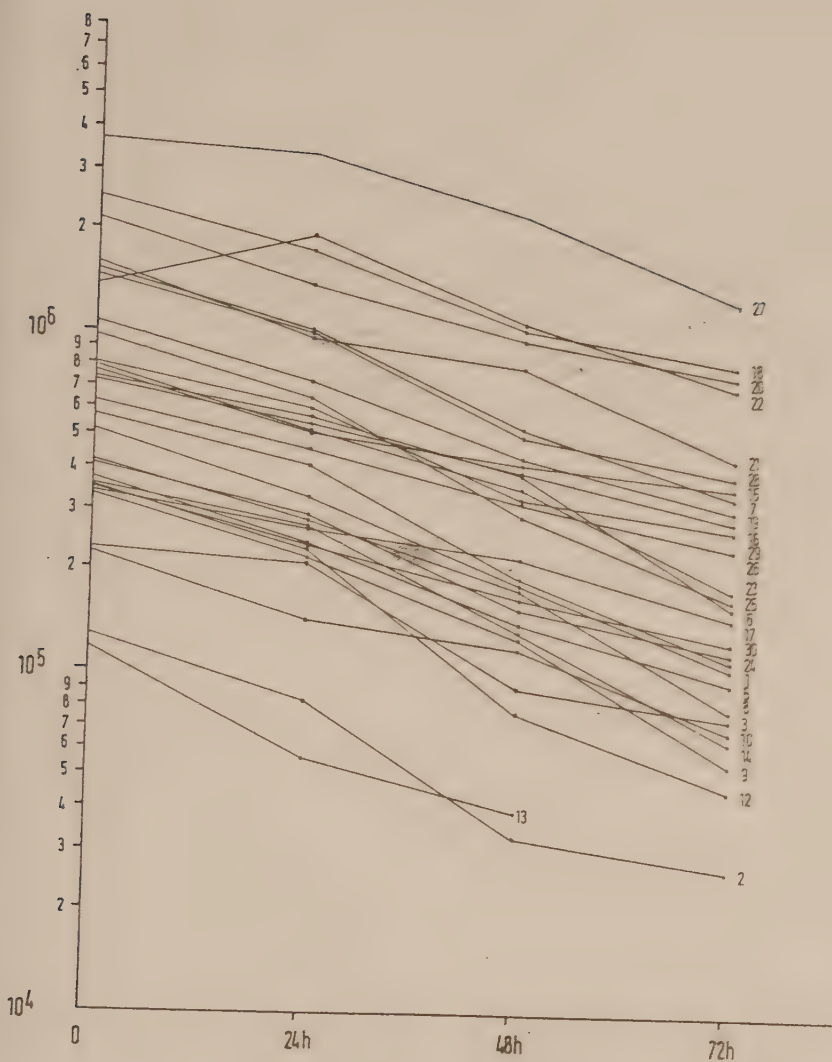


Abbildung 4 a Zahl vitaler Leukozyten/ml Muttermilch in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei +4° C

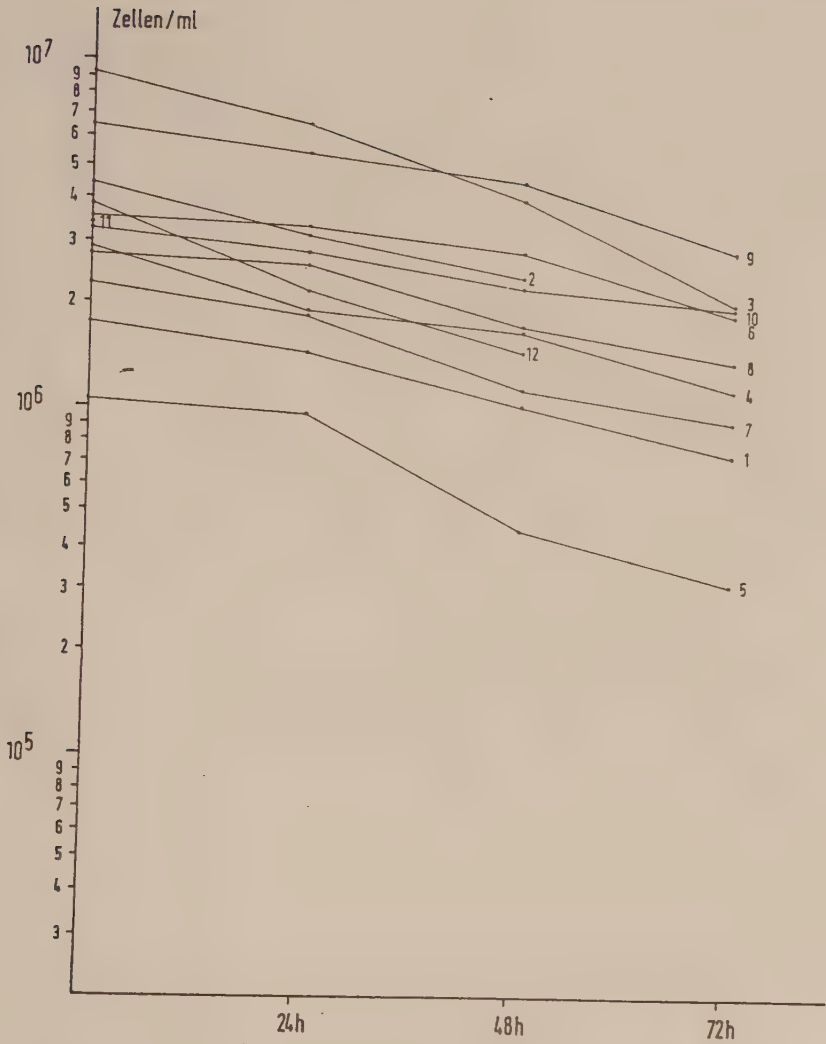


Abbildung 4 b Zahl vitaler Leukozyten/ml Colostrum in
Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei $+4^{\circ}\text{C}$

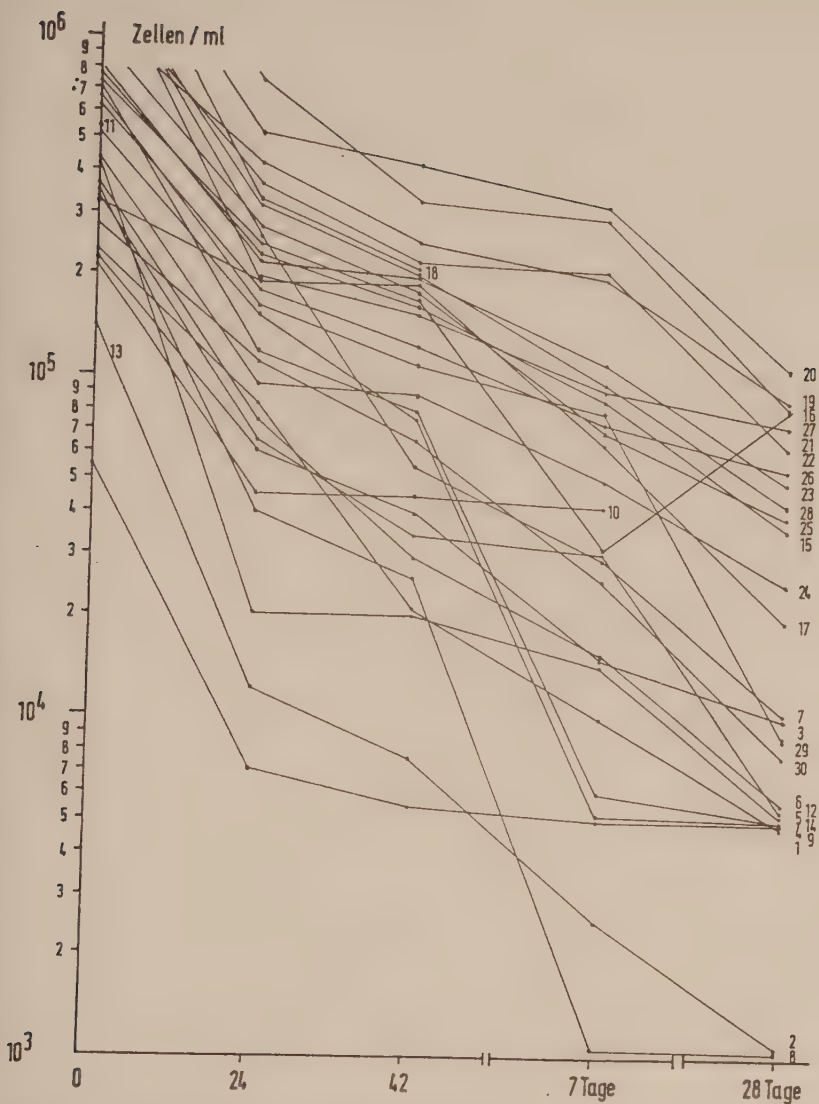


Abbildung 5 a Zahl "vitaler"¹⁾ Leukozyten/ml Muttermilch in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei -18°C

1) "vitale" Leukozyten, d. h. Leukozyten, die noch fähig sind, die Aufnahme von Trypanblau zu verhindern

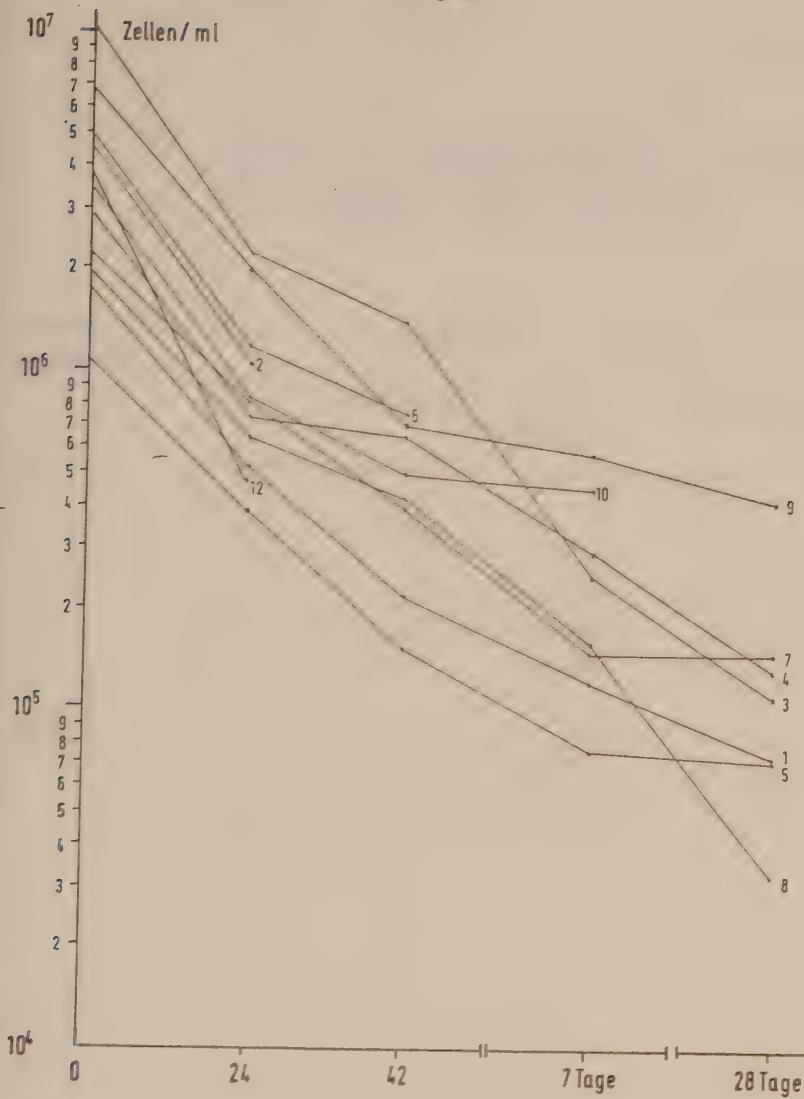


Abbildung 5 b Zahl "vitaler"¹⁾ Leukozyten/ml Colostrum in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei -18°C

1) "vitale" Leukozyten, d. h. Leukozyten, die noch fähig sind, die Aufnahme von Trypanblau zu verhindern

Tabelle 3 a Durchschnittliche Gesamtleukozytenzahl in den
42 Colostrum- und Muttermilchproben (Zellen/ml)
bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Lagerungs- temperatur	Zeit	Leukozyten/ml		
		Mittelwert	Standard- abweichung	Probenzahl
	0 h ¹⁾	$1,8 \cdot 10^6$	$\pm 1,9 \cdot 10^6$	42
+4° C	24 h	$1,6 \cdot 10^6$	$\pm 1,8 \cdot 10^6$	41
	48 h	$1,3 \cdot 10^6$	$\pm 1,5 \cdot 10^6$	41
	72 h	$1,0 \cdot 10^6$	$\pm 9,8 \cdot 10^5$	37
-18° C	24 h	$1,2 \cdot 10^6$	$\pm 1,2 \cdot 10^6$	39
	48 h	$9,1 \cdot 10^5$	$\pm 8,4 \cdot 10^5$	37
	7 Tage	$7,4 \cdot 10^5$	$\pm 6,9 \cdot 10^5$	35
	28 Tage	$6,4 \cdot 10^5$	$\pm 6,3 \cdot 10^5$	33

1) diese Leukozytenzahlbestimmung wurde sofort nach
Gewinnen der Milch durchgeführt

Tabelle 3 b Durchschnittliche Gesamtleukozytenzahl in den Colostrum- und Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Lagerungs- temperatur	Zeit	Leukozyten/ml		Probenzahl
		Mittelwert	Standard- abweichung	
Colostrum				
	0 h ¹⁾	$4,0 \cdot 10^6$	$\pm 2,2 \cdot 10^6$	12
+4° C	24 h	$3,7 \cdot 10^6$	$\pm 2,1 \cdot 10^6$	11
	48 h	$3,1 \cdot 10^6$	$\pm 1,7 \cdot 10^6$	11
	72 h	$2,3 \cdot 10^6$	$\pm 9,6 \cdot 10^5$	11
-18° C	24 h	$2,6 \cdot 10^6$	$\pm 1,4 \cdot 10^6$	11
	48 h	$1,9 \cdot 10^6$	$\pm 7,9 \cdot 10^5$	9
	7 Tage	$1,6 \cdot 10^6$	$\pm 6,6 \cdot 10^5$	8
	28 Tage	$1,4 \cdot 10^6$	$\pm 7,3 \cdot 10^5$	7
Muttermilch				
	0 h ¹⁾	$9,6 \cdot 10^5$	$\pm 8,7 \cdot 10^5$	30
+4° C	24 h	$7,9 \cdot 10^5$	$\pm 7,6 \cdot 10^5$	30
	48 h	$6,7 \cdot 10^5$	$\pm 6,6 \cdot 10^5$	30
	72 h	$6,3 \cdot 10^5$	$\pm 5,7 \cdot 10^5$	28
-18° C	24 h	$6,5 \cdot 10^5$	$\pm 5,4 \cdot 10^5$	28
	48 h	$5,6 \cdot 10^5$	$\pm 4,9 \cdot 10^5$	28
	7 Tage	$4,7 \cdot 10^5$	$\pm 4,0 \cdot 10^5$	27
	28 Tage	$4,3 \cdot 10^5$	$\pm 3,9 \cdot 10^5$	27

1) die Untersuchung wurde sofort nach Gewinnen der Milch durchgeführt

Tabelle 4 Prozentualer Anteil nicht vitaler Leukozyten an der Gesamtleukozytenzahl bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Lage- rungs- tempe- ratur	Zeit	durchschn. Zahl nicht vitaler Leukoz. %	Standard- abweichung	Variations- breite	Proben- zahl
* +4° C	0 h	6,1	± 4,7	0-24,6	42
	24 h	16,9	± 7,8	5,4-30,5	41
	48 h	34,3	± 11,7	15,3-57,0	41
	72 h	47,8	± 13,8	20,0-76,4	37
-18° C	24 h	66,1	± 7,9	48,5-82,8	39
	48 h	74,4	± 8,8	54,2-92,8	37
	7 Tage	85,8	± 7,9	72,9-99,9	34
	28 Tage	91,8	± 4,9	81,9-99,3	33

* wurde bei Versuchsbeginn ohne vorherige Kühlung durchgeführt

Aus den Tabellen 5 a und 5 b lassen sich die Mittelwerte der Anzahl vitaler Leukozyten zu den jeweiligen Temperaturen und Lagerungsbedingungen entnehmen. Dabei gibt Tabelle 5 a die Mittelwerte aller Milchproben, die sich aus Muttermilchproben und Colostrumproben zusammensetzen, wieder. Tabelle 5 b schlüsselt die Ergebnisse für Muttermilch und Colostrum getrennt auf, wobei sich keine großen Unterschiede zwischen Colostrum und Muttermilch ergeben. In den Abbildungen 6, 7 und 8 sind diese Werte graphisch dargestellt.

Während bei $+4^{\circ}\text{C}$ Lagerung der Anteil vitaler Zellen in allen Milchproben innerhalb von 24 h im Mittel auf 77,6 % und nach 48 h auf 48,9 % zurückging, führte Lagerung bei -18°C zu einer Reduktion vitaler Zellen auf durchschnittlich 22,8 % nach 24 h bzw. auf 12,8 % nach 48 h. 7tägige Lagerung bei -18°C führte schließlich zu einer Verminderung der vitalen Leukozyten im Mittel auf 5,4 %. Nach 72 h Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ betrug der Anteil vitaler Leukozyten im Mittel noch 33,1 %. Nach 28 Tagen bei -18°C fanden sich durchschnittlich nur noch 1,7 % vitale Leukozyten. Inwieweit man nach dieser Zeit noch von vitalen Zellen sprechen kann, ist ungewiß. Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung läßt sich nichts über die noch vorhandene Funktionstüchtigkeit der Leukozyten aussagen, und der Mechanismus der Trypanblauanfärbung ist noch unbekannt. Deshalb ist es wohl besser, von Zellen bzw. von "vitalen" Zellen zu sprechen, die noch die Fähigkeit besitzen, das Eindringen von Trypanblau zu verhindern.

Die statistische Auswertung zeigte bei allen Frauenmilchproben eine signifikant höhere Abnahme der Zahl vitaler Zellen durch Lagerung bei -18°C als bei $+4^{\circ}\text{C}$ ($p \leq 0,001$).

Tabelle 5 a Durchschnittliche Zahl "vitaler" Leukozyten/ml
Milch bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Lagerungs- temperatur	Zeit	Leukozyten/ml		
		Mittelwert	Standard- abweichung	Probenzahl
	0 h ¹⁾	$1,7 \cdot 10^6$	$\pm 1,8 \cdot 10^6$	42 ²⁾
+4° C	24 h	$1,4 \cdot 10^6$	$\pm 1,5 \cdot 10^6$	41
	48 h	$9,1 \cdot 10^5$	$\pm 1,1 \cdot 10^6$	41
	72 h	$4,4 \cdot 10^5$	$\pm 5,6 \cdot 10^5$	37
	7 Tage	-	-	-
	28 Tage	-	-	-
-18° C	24 h	$4,4 \cdot 10^5$	$\pm 5,6 \cdot 10^5$	39
	48 h	$2,4 \cdot 10^5$	$\pm 2,8 \cdot 10^5$	37
	72 h	-	-	-
	7 Tage	$1,2 \cdot 10^5$	$\pm 1,4 \cdot 10^5$	35
	28 Tage	$5,6 \cdot 10^4$	$\pm 7,5 \cdot 10^4$	33

1) diese Bestimmung der Leukozytenzahl wurde zu Versuchsbeginn aus der frisch gewonnenen Milch ohne vorherige Lagerung durchgeführt

2) die 42 Milchproben setzen sich aus 12 Colostrum- und 30 Muttermilchproben zusammen

Tabelle 5 b Mittelwerte der "vitalen" Leukozyten/ml Milch in den Colostrum- und Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Lagerungs- temperatur	Zeit	Leukozyten/ml		Probenzahl
		Mittelwert	Standard- abweichung	
Colostrum				
+4° C	0 h ¹⁾	3,8·10 ⁶	±2,2·10 ⁶	12
	24 h	3,1·10 ⁶	±1,8·10 ⁶	11
	48 h	2,2·10 ⁶	±1,2·10 ⁶	11
	72 h	1,5·10 ⁶	±8,1·10 ⁵	9
-18° C	24 h	1,0·10 ⁶	±5,6·10 ⁵	11
	48 h	5,7·10 ⁵	±2,8·10 ⁵	9
	7 Tage	2,6·10 ⁵	±1,3·10 ⁵	8
	28 Tage	1,4·10 ⁵	±7,5·10 ⁴	7
Muttermilch				
+4° C	0 h ¹⁾	8,6·10 ⁵	±7,9·10 ⁵	30
	24 h	6,9·10 ⁵	±7,3·10 ⁵	30
	48 h	4,5·10 ⁵	±5,1·10 ⁵	30
	72 h	3,3·10 ⁵	±3,4·10 ⁵	28
-18° C	24 h	2,1·10 ⁵	±1,8·10 ⁵	28
	48 h	1,3·10 ⁵	±1,0·10 ⁵	28
	7 Tage	7,5·10 ⁴	±9,2·10 ⁴	27
	28 Tage	3,3·10 ⁴	±3,3·10 ⁴	26

1) diese Bestimmung der Leukozytenzahl wurde zu Versuchsbeginn aus der frisch gewonnenen Milch ohne vorherige Lagerung durchgeführt

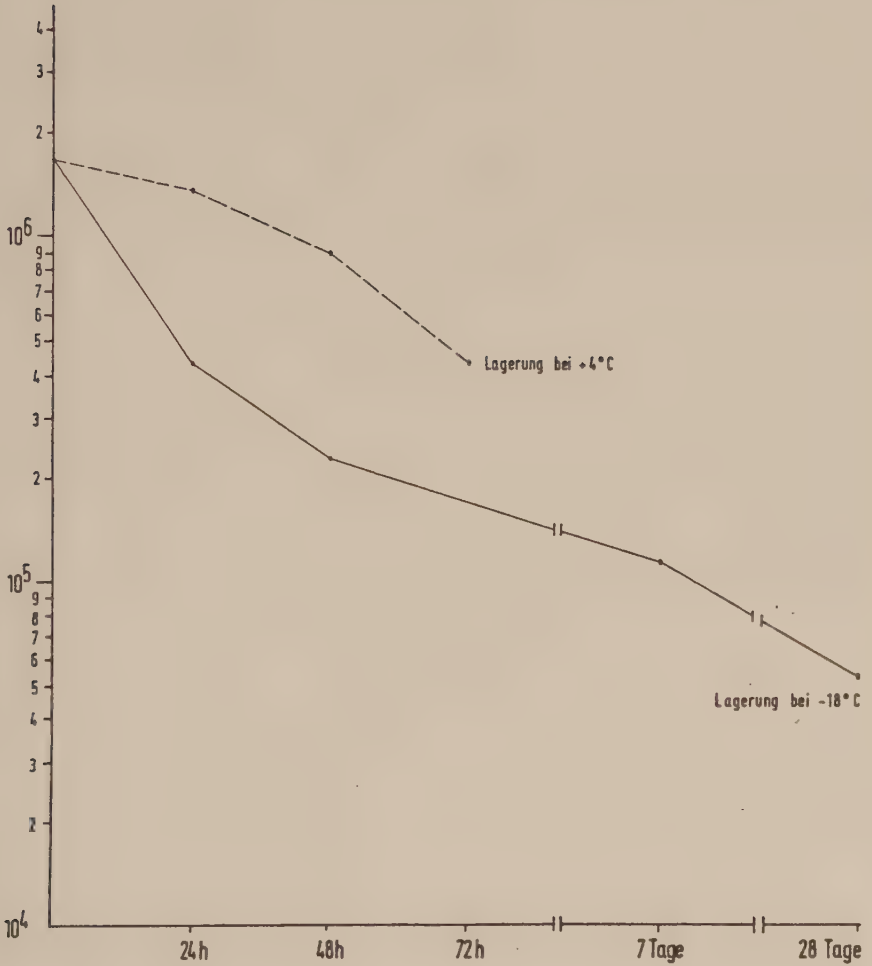


Abbildung 6 Mittelwerte der vitalen Leukozyten in den 42 Colostrum- und Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

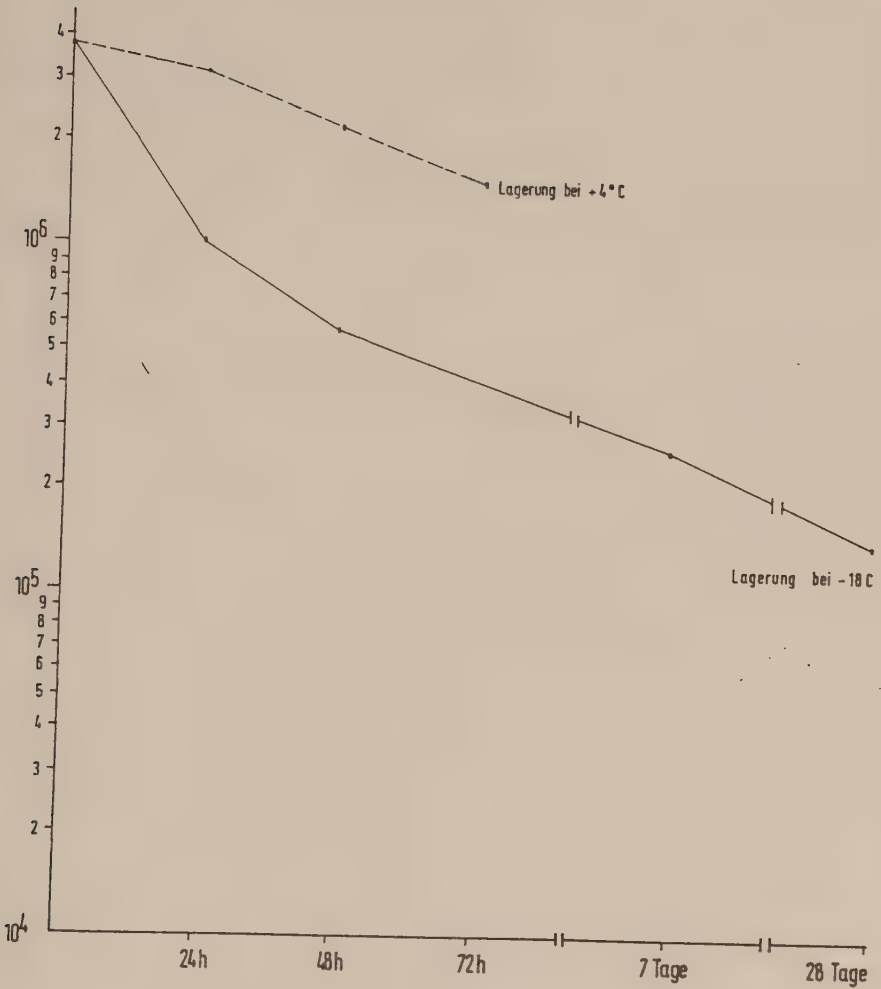


Abbildung 7 Durchschnittliche Zahl vitaler Leukozyten/ml
Milch in den 12 Colostrumproben bei verschie-
denen Lagerungsbedingungen

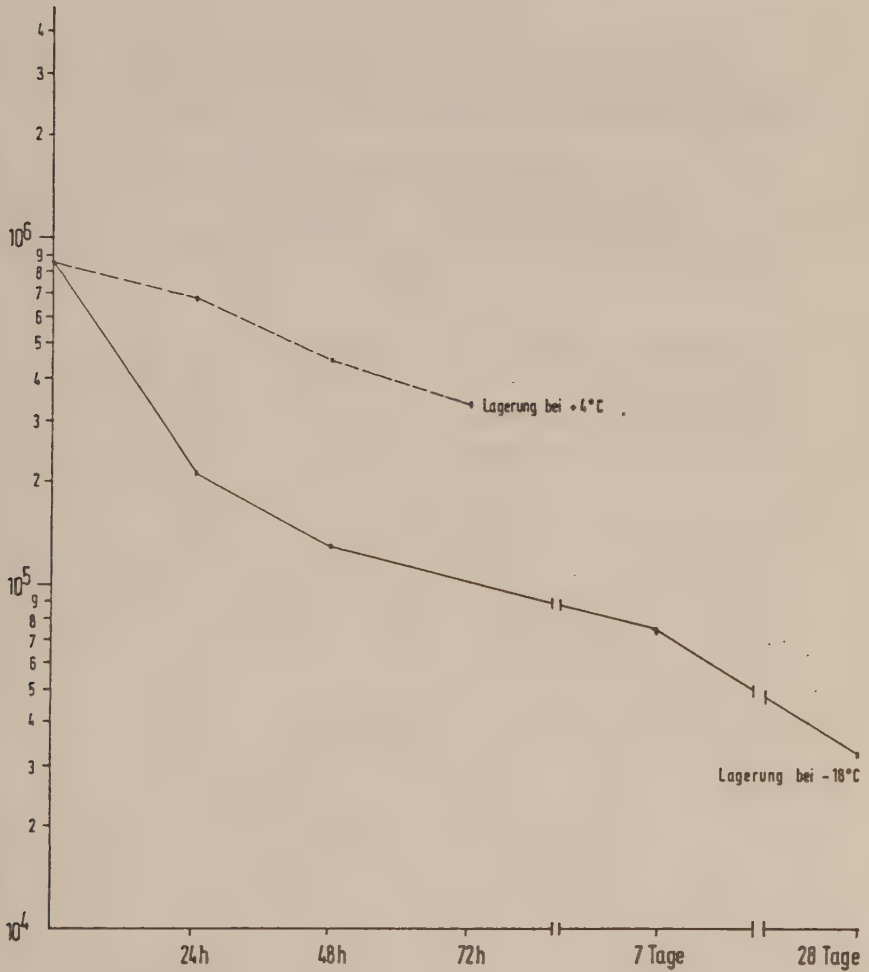


Abbildung 8 Mittelwerte der vitalen Leukozyten/ml Milch in den 30 Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

3. Verhalten der Leukozyten in mit E. coli beimpften Milchproben unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Um etwaige Auswirkungen bakterieller Kontamination auf die Leukozytenzahl zu untersuchen, wurden die Milchproben 1 - 10 mit E. coli beimpft und die Leukozytenzahl nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -18°C erneut bestimmt.

Tabelle 6 faßt die Mittelwerte der Gesamtleukozytenzahl zu den verschiedenen Zeiten bei $+4^{\circ}\text{C}$ und -18°C sowie den prozentualen Anteil vitaler Leukozyten zusammen und vergleicht sie mit den entsprechenden Werten unbeimpfter Milch. In Abbildung 9 ist dieser Vergleich graphisch dargestellt. Die Tabelle 7 gibt die mittlere Anzahl der vitalen Leukozyten wieder. Die Einzelwerte für die vitalen Leukozyten sind in den Abbildungen 10 und 11 graphisch dargestellt. Wie aus den in Tabelle 7 dargestellten Werten hervorgeht, nimmt die Gesamtzahl sowie die Zahl vitaler Leukozyten in der beimpften Milch nicht signifikant stärker ab als in unbeimpfter Milch. Die Zellzahl reduziert sich nach 72 h Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Mittel auf 20,4 % bei den mit E. coli beimpften Milchproben und auf 24,3 % bei den entsprechenden unbeimpften Proben. Bei -18°C Lagerung waren nach 7 Tagen in den beimpften Milchproben nur noch im Mittel 3,7 % der ursprünglichen Zellzahl vorhanden, in den unbeimpften Milchproben waren es im Mittel nur noch 1,9 %.

Wie bei unbeimpfter Milch wird auch bei beimpfter Milch die Leukozytenzahl stark von der Lagerungstemperatur beeinflusst. Lagerung bei -18°C führt zu einer signifikant ($p \leq 0,001$) stärkeren Reduktion der vitalen Leukozyten/ml Muttermilch als Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$. Es ergibt sich somit kein Hinweis darauf, daß die Leukozytenzahl durch eine stärkere bakterielle Kontamination eine größere Reduktion erfährt. Die möglicherweise

ablaufende Phagozytose von Bakterien durch Milchleukozyten führt nicht zu einer signifikant rascheren Abnahme der Leukozytenzahl ($p > 0,05$).

Zur Tabelle 6:

- 1) in Klammern gesetzte Werte geben den prozentualen Anteil vitaler Leukozyten wieder
- 2) Bestimmung bei Versuchsbeginn ($t = 0$) wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt
- 3) wurde nicht bestimmt
- 4) Standardabweichung

Tabelle 6 Vergleich der Mittelwerte der Gesamtleukozytenzahl (Zellen/ml) von 10 mit E. coli beimpften Milchproben mit den entsprechenden unbeimpften Milchproben bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

Lagerungs- temperatur	Zeit	beimpfte Proben	unbeimpfte Proben
+4° C	0 h ²⁾	$5,4 \cdot 10^5 \pm 4,1 \cdot 10^5$ ⁴⁾ (93,0 %)	$5,4 \cdot 10^5 \pm 4,0 \cdot 10^5$ (93,0 %)
	24 h	$3,5 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^5$ (77,4 %)	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,9 \cdot 10^5$ (82,8 %)
	48 h	$3,2 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^5$ (64,4 %)	$3,5 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^5$ (64,9 %)
	72 h	$2,5 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$ (47,5 %)	$3,2 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$ (54,5 %)
	7 Tage	-3)	-3)
-18° C	24 h	$3,4 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^5$ (24,8 %)	$3,4 \cdot 10^5 \pm 2,7 \cdot 10^5$ (26,8 %)
	48 h	-3)	-3)
	72 h	-3)	-3)
	7 Tage	$3,0 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$ (9,7 %)	$2,7 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$ (5,8 %)

Tabelle 7 "Vitale" Leukozyten (Zellen/ml) in den 10 beimpften Milchproben im Vergleich mit den "vitalen" Leukozyten in den entsprechenden unbeimpften Milchproben bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

Lagerungs- temperatur	Zeit	beimpfte Proben	unbeimpfte Proben
	0 h ³⁾	$5,1 \cdot 10^5 \pm 4,0 \cdot 10^5$ ²⁾³⁾	$5,0 \cdot 10^5 \pm 4,0 \cdot 10^5$
+4° C	24 h	$2,8 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^5$
	48 h	$2,0 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5 \pm 1,7 \cdot 10^5$
	72 h	$1,2 \cdot 10^5 \pm 1,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5 \pm 0,9 \cdot 10^5$
	7 Tage	- ₁₎	- ₁₎
-18° C	24 h	$7,2 \cdot 10^4 \pm 5,3 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^4 \pm 7,6 \cdot 10^4$
	48 h	- ₁₎	- ₁₎
	72 h	- ₁₎	- ₁₎
	7 Tage	$2,5 \cdot 10^4 \pm 2,3 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4 \pm 1,3 \cdot 10^4$

1) nicht bestimmt

2) Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

3) Bestimmung bei Versuchsbeginn (t=0) wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt

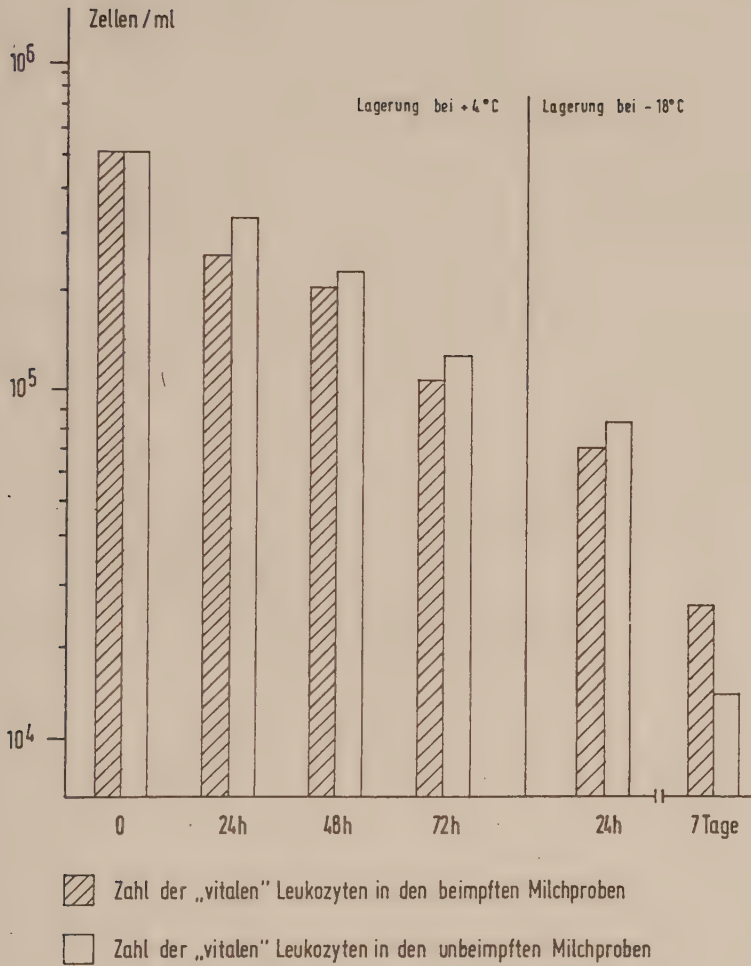


Abbildung 9 Zahl der vitalen Leukozyten/ml Muttermilch in den beimpften Milchproben im Vergleich mit den entsprechenden unbeimpften Muttermilchproben bei vorgegebenen Lagerungsbedingungen

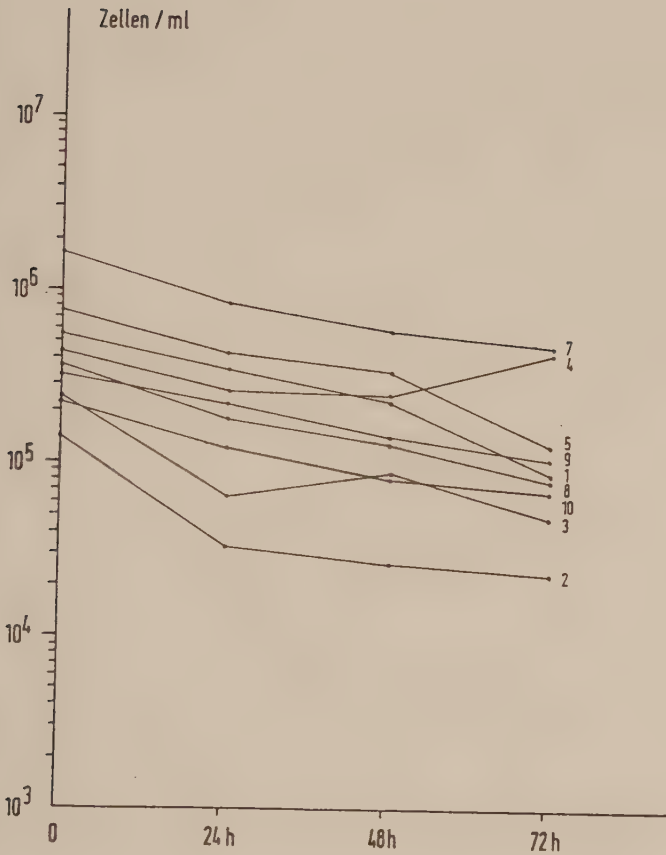


Abbildung 10 Zahl vitaler Leukozyten in jeder mit E.coli beimpften Muttermilchprobe in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei $+4^{\circ}\text{C}$

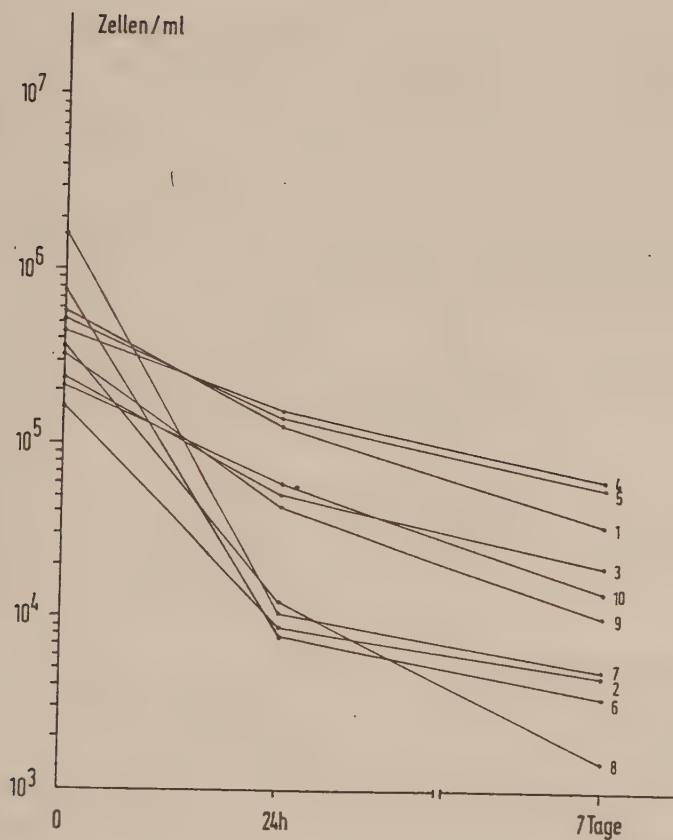


Abbildung 11 Zahl vitaler Leukozyten in jeder mit *E. coli* beimpften Muttermilchprobe in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer bei -18°C

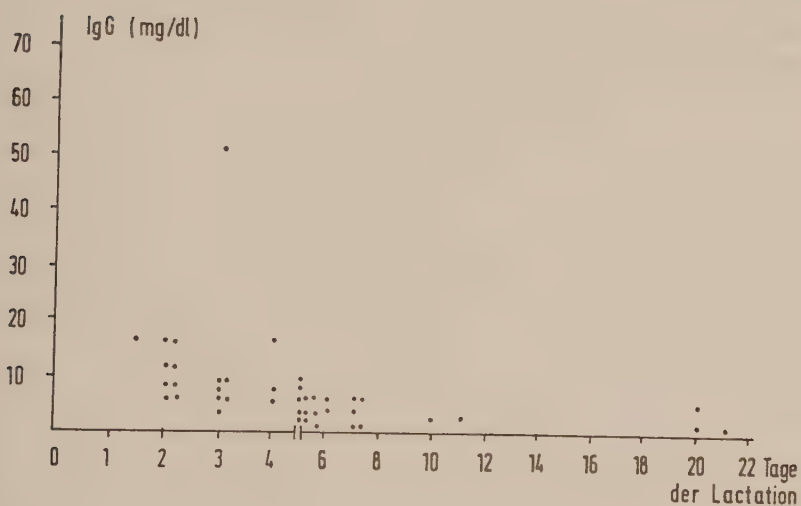
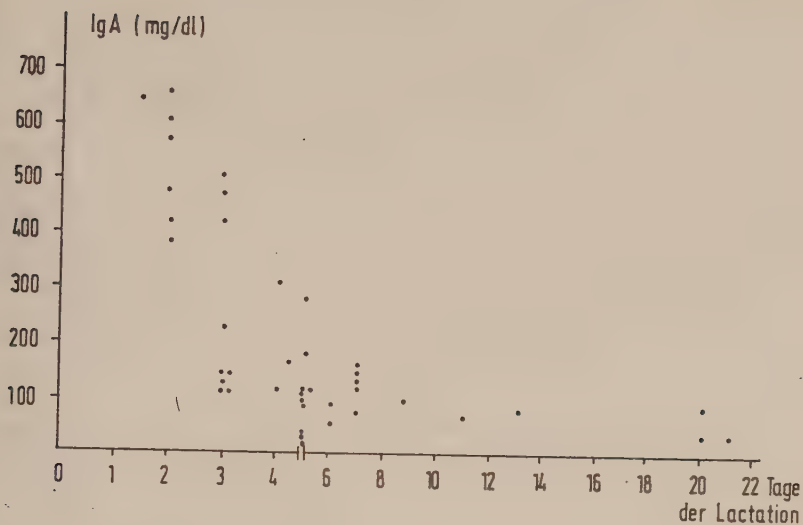
B. Immunglobuline

1. Immunglobulingehalt des frischen Colostrums bzw. der frischen Muttermilch

Die Konzentration der Immunglobuline IgA, IgG und IgM war in den einzelnen Colostrum- bzw. Muttermilchproben individuell sehr unterschiedlich. Diese Schwankungen kommen dadurch zustande, daß auch der Immunglobulingehalt der Milch stark von der täglich produzierten Milchmenge sowie von der Laktationsdauer abhängig ist. In Abbildung 12 ist die Abhängigkeit des Immunglobulingehaltes des Colostrum bzw. der Muttermilch von der Laktationsdauer graphisch dargestellt. Die erhöhte Punktdichte um den 3. Tag der Laktation ergibt sich aus der Tatsache, daß nicht alle Milchproben, die am 3. Tag gewonnen wurden, dem Colostrum zugerechnet werden konnten, da von diesen die tägliche Milchmenge von 100 g überschritten wurde.

In 12 frisch gewonnenen Colostrumproben (1. - 4. der Laktation und tägliche Milchmenge < 100 g) betrug der Gehalt an IgA im Mittel $477,4 \pm 137,2$ mg/dl, an IgG im Mittel $14,5 \pm 12,4$ mg/dl und an IgM im Mittel $60,5 \pm 37,5$ mg/dl.

Mit zunehmender Milchproduktion und Dauer der Laktation sank der Immunglobulingehalt auf ein Viertel bis ein Fünftel der Colostrumwerte. So fand man in den 30 Muttermilchproben (5. - 21. Tag der Laktation) einen mittleren Gehalt an IgA von $109,2 \pm 64,1$ mg/dl, an IgG von $4,8 \pm 2,1$ mg/dl und an IgM von $15,8 \pm 8,2$ mg/dl Milch. Die Mittelwerte und Variationsbreiten sind in Tabelle 8 aufgeführt.



Abbildungen 12 a und b Darstellung des Immunglobulingehalts des Colostrums bzw. der Muttermilch in Abhängigkeit von der Laktationsdauer

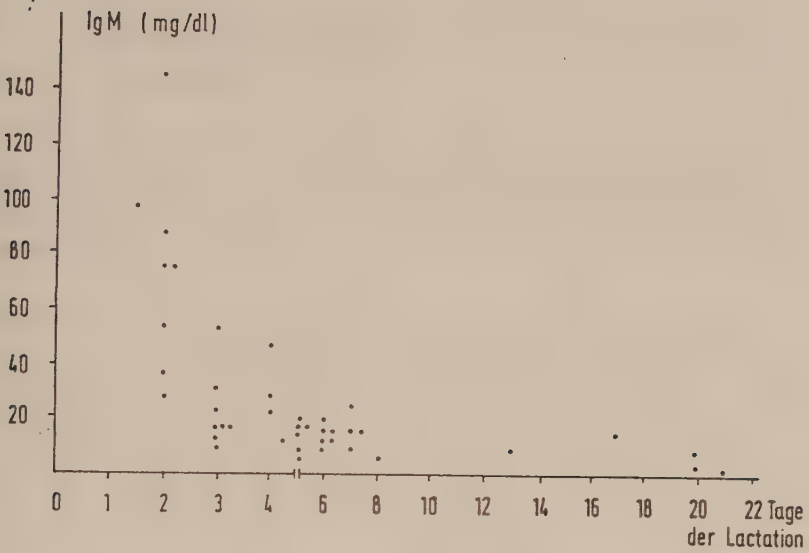


Abbildung 12 c Darstellung des Immunglobulingehalts des Colostrums bzw. der Muttermilch in Abhängigkeit von der Laktationsdauer

2. Auswirkungen verschiedener Lagerungsbedingungen auf den Immunglobulingehalt der Muttermilch bzw. des Colostrums

Um den Einfluß von Lagerungszeit und Lagerungstemperatur auf den Immunglobulingehalt der Milch zu untersuchen, wurden 12 Colostrumproben und 30 Muttermilchproben unter vorgegebenen Bedingungen aufbewahrt.

Bei der Lagerung der Muttermilch und des Colostrums bei $+4^{\circ}\text{C}$ über 72 h konnte keine signifikante Reduktion ($p > 0,05$) des Immunglobulingehalts festgestellt werden. Geringfügige Abweichungen liegen innerhalb des methodisch bedingten Meßfehlers. Die Werte für IgA, IgG und IgM blieben in allen Proben über die 72 h Lagerungszeit konstant, was sich aus den in Tabelle 8 (s. S. 54) aufgeführten Mittelwerten ablesen läßt. Wie sich aus den Graphiken 13 bis 15 entnehmen läßt, gilt die festgestellte Stabilität des Immunglobulingehalts auch für die individuellen Milchproben.

Auch die Lagerung des Colostrums und der Muttermilch bei -18°C über einen Zeitraum von 28 Tagen führte zu keiner signifikanten Reduktion ($p > 0,05$) an IgA, IgG und IgM. Wie aus den jeweiligen Mittelwerten (siehe Tabelle 8, Seite 54) ersichtlich ist, hat eine Temperatur von -18°C somit keinerlei destruktiven Einfluß auf den Immunglobulingehalt der Milch. Die Konstanz des Immunglobulingehalts bei -18°C ist auch aus den Graphiken 13 bis 15, in denen der IgA-, IgG- und IgM-Gehalt der einzelnen Milchproben zu den festgelegten Lagerungszeiten dargestellt ist, ersichtlich.

Tabelle 8

Mittelwert, Standardabweichung und Variationsbreite des Immunglobulingehalts (mg/100 ml) der Muttermilch bzw. des Colostrums unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Temp.	Untersuchungs- Zeit- punkt	Proben- zahl	Immunglobulingehalt im <u>Colostrum</u>		
			IgA	IgG	IgM
24°C	0	12	477,4±137,2	14,5±12,7	60,6±37,5
RT			(661,1-227,0) ¹	(5,9-53,1)	(13,2-142,5)
+4°C	24 h	12	473,9±141,8	14,4±14,4	59,4±38,3
	48 h	12	472,5±141,1	13,3±13,8	59,0±37,8
	72 h	11	482,6±144,1	14,0±14,5	55,7±37,9
-18°C	24 h	12	442,0±178,4	13,7±13,8	57,4±38,7
	48 h	10	485,6±140,8	14,7±14,1	57,2±37,9
	7 Tage	9	472,0±146,2	14,8±16,0	58,1±40,4
	28 Tage	7	424,0±140,9	16,1±16,6	42,4±30,5

¹ Variationsbreite (entsprechende Variationsbreiten gelten auch für nachfolgend angeführte Mittelwerte)

Immunglobulingehalt der Muttermilch

IgA

IgG

IgM

Proben-
zahl

30	109,2 $\pm$ 64,1 (31,0-306,5)	4,8 $\pm$ 2,1 (1,8-7,9)	15,8 $\pm$ 8,2 (4,9-46,8)
30	103,0 $\pm$ 62,9	4,7 $\pm$ 2,0	15,6 $\pm$ 9,0
30	101,7 $\pm$ 62,1	4,9 $\pm$ 2,4	15,4 $\pm$ 8,7
30	101,1 $\pm$ 60,1	4,4 $\pm$ 2,2	15,3 $\pm$ 8,9
30	104,5 $\pm$ 63,9	4,6 $\pm$ 2,1	15,6 $\pm$ 9,3
29	104,8 $\pm$ 64,1	4,6 $\pm$ 2,4	15,0 $\pm$ 9,9
28	103,9 $\pm$ 60,8	4,3 $\pm$ 1,8	14,8 $\pm$ 9,9
28	104,0 $\pm$ 60,4	4,2 $\pm$ 1,7	14,6 $\pm$ 9,4

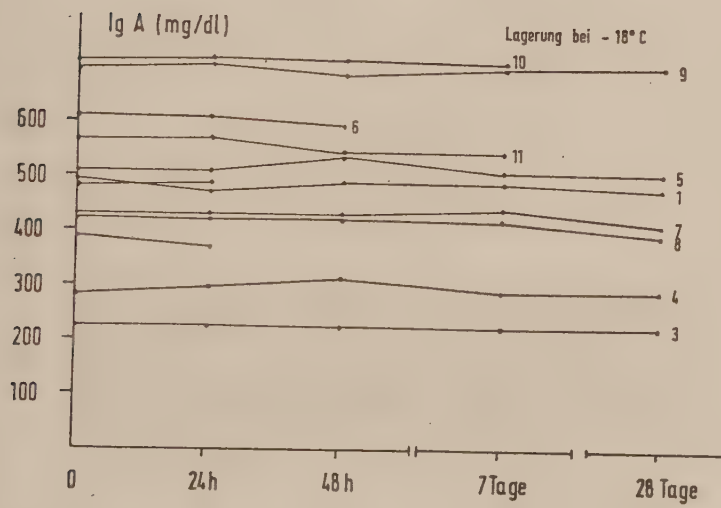
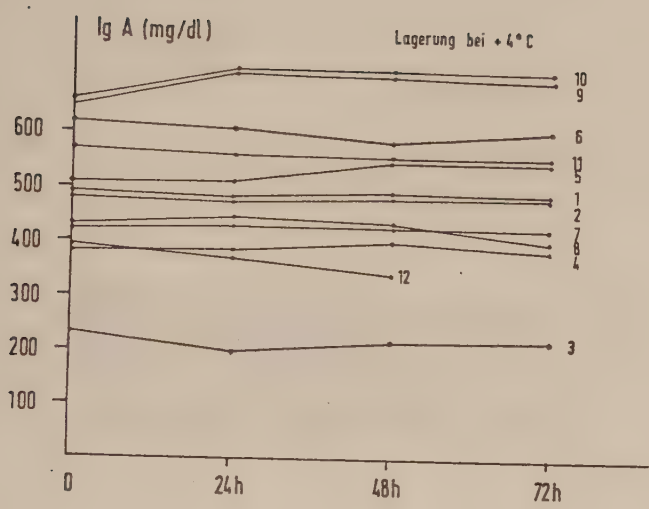


Abbildung 13 a IgA-Gehalt der 12 Colostrumproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

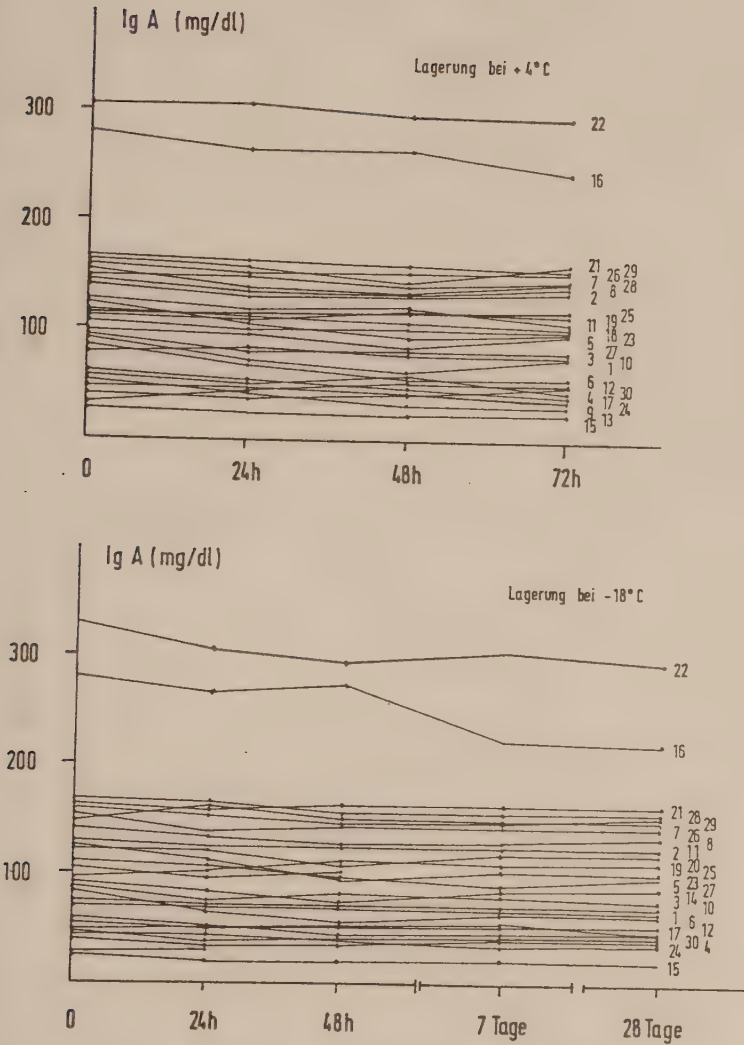


Abbildung 13 b IgA-Gehalt der 30 Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

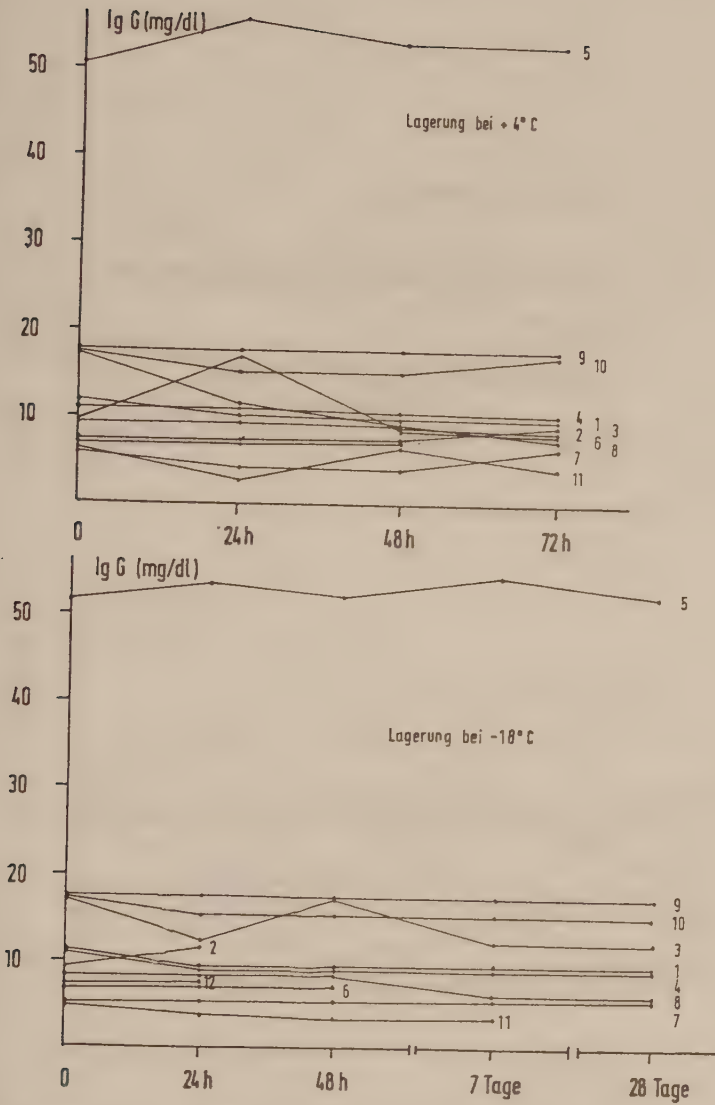


Abbildung 14 a IgG-Gehalt der 12 Colostrumproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

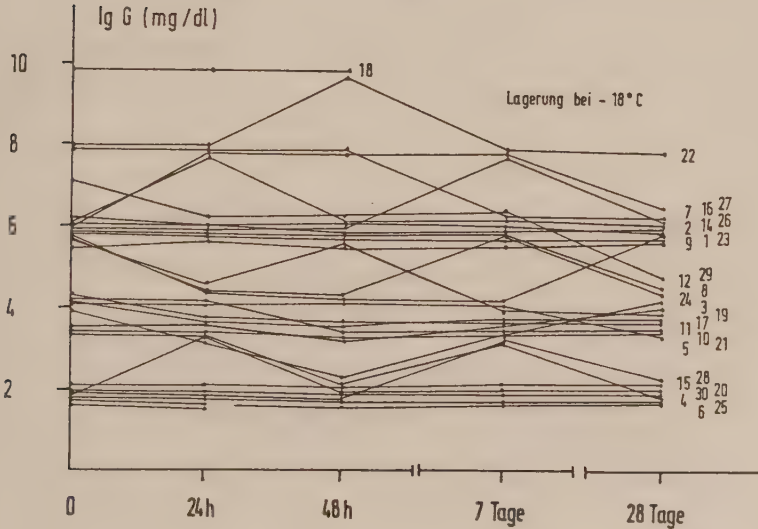
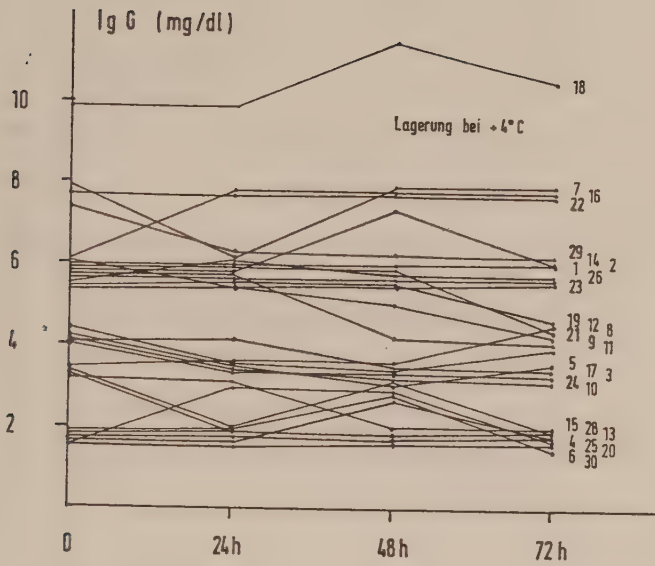


Abbildung 14 b IgG-Gehalt der 30 Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

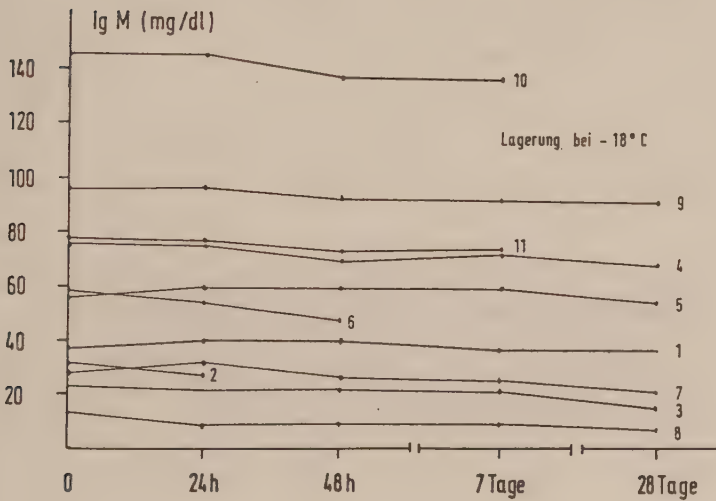
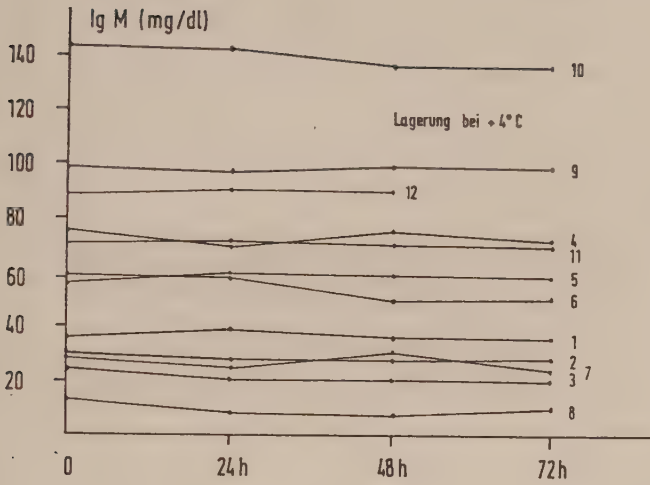


Abbildung 15 a IgM-Gehalt der 12 Colostrumproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

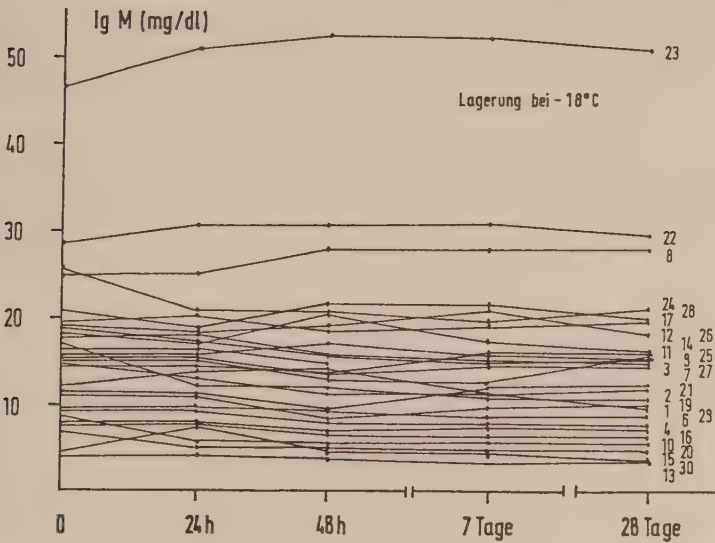
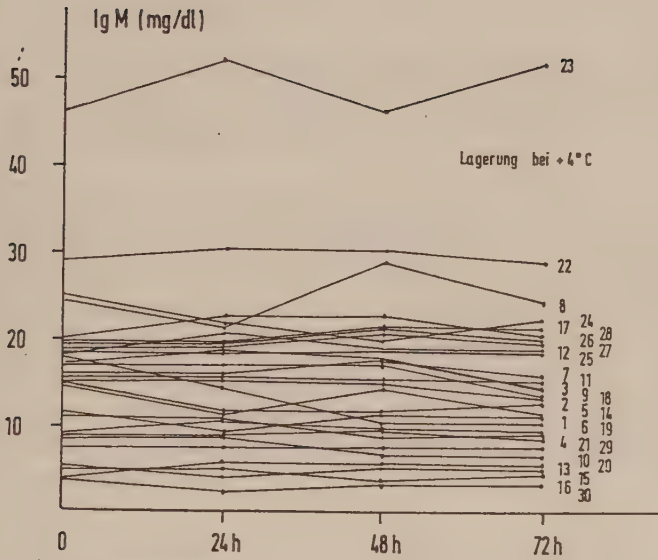


Abbildung 15 b IgM-Gehalt der 30 Muttermilchproben bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

3. Verhalten des Immunglobuliningehalts in E. coli beimpfter Muttermilch unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Um etwaige Auswirkungen bakterieller Kontamination auf den Immunglobuliningehalt der Muttermilch zu untersuchen, wurden 10 Milchproben mit E. coli beimpft und den gleichen Lagerungsbedingungen unterworfen wie die unbeimpfte Muttermilch. Dabei kam es sowohl nach 72 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ als auch nach 7 Tagen bei -18°C zu keiner signifikanten Reduktion des Immunglobuliningehalts ($p > 0,05$). Die Werte für IgA, IgG und IgM stimmen weitgehend mit den entsprechenden Werten unbeimpfter Milchproben überein.

Die Tabelle 9 vergleicht die Mittelwerte von IgA, IgG und IgM der beimpften Milchproben mit den Mittelwerten der entsprechenden unbeimpften Milchproben unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen.

Es konnte somit kein Einfluß bakterieller Kontaminationen auf den Immunglobuliningehalt der Muttermilch festgestellt werden, unabhängig von den jeweiligen Lagerungsbedingungen.

Tabelle 9 Vergleich der Mittelwerte des Gehalts an IgA, IgG und IgM der 10 beimpften mit den Mittelwerten der entsprechenden 10 unbeimpften Muttermilchproben

Immunglobulingehalt (mg/dl) der mit E. coli beimpften
10 Muttermilchproben

Temperatur	Zeit ¹⁾	IgA	IgG	IgM
+24° C	0 h	94,7 ±38,9	4,7 ±1,9	14,3 ±4,7
+ 4° C	24 h	84,1 ±36,9	4,2 ±2,1	14,2 ±5,4
	48 h	79,9 ±36,1	4,1 ±2,1	13,4 ±5,4
	72 h	78,9 ±36,5	4,2 ±1,8	13,8 ±5,2
-18° C	24 h	81,9 ±35,6	3,8 ±1,7	12,9 ±4,5
	7 Tage	79,8 ±34,9	3,7 ±1,6	13,2 ±5,1

Immunglobulingehalt (mg/dl) der unbeimpften
10 Muttermilchproben

+24° C	0 h	94,7 ±38,9	4,8 ±1,9	14,3 ±4,7
+ 4° C	24 h	94,7 ±24,1	4,4 ±1,8	13,6 ±5,3
	48 h	85,3 ±39,3	5,3 ±2,2	14,3 ±5,3
	72 h	87,7 ±37,6	4,2 ±2,1	13,6 ±4,2
-18° C	24 h	86,8 ±38,0	4,5 ±1,8	14,1 ±4,1
	7 Tage	87,2 ±36,9	4,4 ±2,1	15,8 ±4,8

1) Zeitpunkt, zu dem die Untersuchung durchgeführt wurde

C. Bakteriologische Untersuchungen

1. Bakterienflora der 42 unbehandelten frischen Colostrum- und Muttermilchproben

Um festzustellen, welche Keime hauptsächlich in der Muttermilch auftreten und ob sich die angegebenen Lagerungsbedingungen unterschiedlich auf verschiedene Keime auswirken, wurde zunächst eine qualitative Bestimmung der vorhandenen Keime durchgeführt, wobei die mit gewisser Regelmäßigkeit in der MM vorkommenden anaeroben und aeroben Lactobazillen nicht berücksichtigt wurden (11).

Wie Tabelle 10 zeigt, waren alle 42 Proben (12 Colostrum- und 30 Muttermilchproben) mit Hautkeimen kontaminiert, wobei sich neben dem stets vorhandenen Staph. epidermidis in zwei Fällen auch noch vergrünende Streptokokken nachweisen ließen. In 11,9 % der 42 untersuchten Proben konnten außerdem potentiell pathogene Keime gefunden werden. Das Auftreten pathogener Keime ist jedoch stark von der Sorgfalt, die auf die Einhaltung steriler Bedingungen bei der Milchgewinnung verwandt wird, abhängig. So waren von den 32 Proben, die unter der im Methodenteil beschriebenen Überwachung gewonnen wurden, lediglich 3,1 % mit potentiell pathogenen Bakterien kontaminiert, während von den restlichen 10 aus dem Kühlschrank entnommenen Proben 30 % mögliche pathogene Keime enthielten.

Neben einem geringeren Auftreten potentiell pathogener Keime weisen die unter strikter Einhaltung steriler Bedingungen gewonnenen Milchproben auch generell einen niedrigeren Bakterientiter als die 10 aus dem Kühlschrank entnommenen Proben auf, wie Tabelle 11 zeigt.

Tabelle 10 Keimgehalt der 42 Muttermilchproben:
Qualitative Bestimmung

Keimart	Gesamtzahl kontaminierter Proben	prozentualer Anteil kontaminierter Proben
I. Hautkeime		
Staph. epidermidis	42 (10) ¹⁾	100,00 %
vergrünende Streptokokken	2	4,76 %
II. Potentiell pathogene Keime		
Staph. aureus (Koagulase positiv)	1	2,38 %
Pneumokokken	1 (1) ¹⁾	2,38 %
gramnegative Enterobacteriaceae	2 (1)	4,76 %
Neisserien	1 (1)	2,38 %

1) die Zahlen in Klammern betreffen denjenigen Anteil der Milchproben, der nicht unter sterilen Kautelen gewonnen wurde

Tabelle 11 . Keimgehalt von 42 Milchproben:
Quantitative Bestimmung

	Anzahl der Proben mit einem Bakterientiter			
	10^3	10^4	10^5	10^6
Steril gewonnene Proben (32)	5	18 (1) ¹⁾	9 (1) ¹⁾	-
dem Kühlschrank entnommene Proben (10)	-	3 (2) ¹⁾	5	2 (1) ¹⁾

1) Anzahl der mit potentiell pathogenen Keimen verunreinigter Milchproben in der jeweiligen Gruppe

Von den 32 steril gewonnenen Proben sind 71,8 % (23 Proben), von den 10 aus dem Kühlschrank entnommenen nur 30 % (3 Proben) als bakteriologisch völlig unbedenklich anzusehen. Wie Tabelle 11 außerdem zeigt, läßt ein hoher Bakterientiter nicht auf eine Verunreinigung mit potentiell pathogenen Keimen, z. B. *Staphylococcus aureus* schließen. Die Kontamination mit pathogenen Keimen weist also keine Abhängigkeit von der Zahl nicht pathogener Bakterien der Milch auf.

Sämtliche Keimzahlbestimmungen wurden sowohl quantitativ als auch semiquantitativ durchgeführt. Die semiquantitative Keim-

zählbestimmung ermöglicht eine einfache, auch routinemäßig durchführbare Kontrolle des Keimgehalts der Muttermilch. Um zu sehen, ob beide Methoden vergleichbare Resultate liefern, wurden die Ergebnisse der quantitativen mit denen der semiquantitativen Keimzahlbestimmung verglichen. Die nachfolgende Tabelle 12 stellt die mittleren Keimzahlen der 32 steril gewonnenen und der 10 dem Kühlschrank entnommenen Milchproben, wie sie sich aus quantitativer und semiquantitativer Bestimmung ergaben, gegenüber. Wie diese Tabelle zeigt, weichen die Ergebnisse von quantitativer bzw. semiquantitativer Bestimmung nicht signifikant ($p > 0,05$) voneinander ab. Dies bestätigt sich auch bei allen im folgenden dargestellten Keimzahlbestimmungen (siehe Tabelle 13). Lediglich die Zahl der Milchproben, die weniger als 10^4 Keime/ml enthalten, also unbedenklich roh verfüttert werden können, war nach der Uricult-Methode etwas geringer (21 Proben mit $< 10^4$ Keimen/ml) als bei der quantitativen Methode (26 Proben $< 10^4$ Keime/ml).

Beide Methoden sind demnach für derartige Untersuchungen in gleichem Maß als geeignet anzusehen. Der Übersichtlichkeit halber werden in den folgenden Tabellen nur noch die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung dargestellt.

In Abbildung 16 ist der Vergleich der Ergebnisse von quantitativer und semiquantitativer Keimzahlbestimmung, ausgedrückt als mittlere Bakterienzahl/ml Milch zu den jeweiligen Zeiten, graphisch dargestellt.

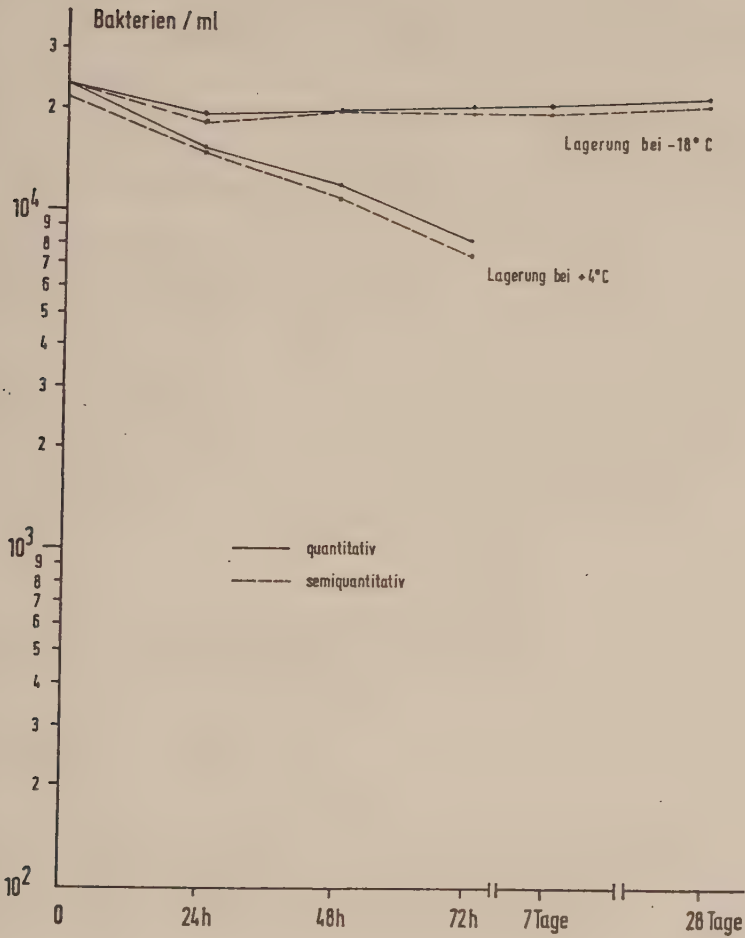


Abbildung 16 Vergleich der Mittelwerte der Bakterien/ml Milch aus quantitativer und semiquantitativer Keimzahlbestimmung bei vorgegebenen Lagerungsbedingungen

Tabelle 12 Mittlere Keimzahl von 42 Milchproben:
Vergleich der Ergebnisse aus quantitativer und
semiquantitativer Bestimmung (Bakterien/ml Milch)

	Quantitativ	(Uricult) Semiquantitativ
Mittlere Keimzahl der 32 steril gewon- nenen Milchproben	$8,4 \cdot 10^3$ ($\pm 1,2 \cdot 10^4$)*)	$7,3 \cdot 10^3$ ($\pm 1,7 \cdot 10^4$)
Mittlere Keimzahl der 10 dem Kühl- schrank entnomme- nen Proben	$5,0 \cdot 10^4$ ($\pm 4,2 \cdot 10^4$)	$5,4 \cdot 10^4$ ($\pm 4,8 \cdot 10^4$)

*) die in Klammern angegebenen Werte sind die Standard-
abweichungen zu den Mittelwerten

Überschrift zu Tabelle 13:

Vergleich der Ergebnisse von quantitativer und semiquantita-
tiver Keimzahlbestimmung, ausgedrückt als mittlere Bakterien-
zahl/ml Milch zu den jeweiligen Zeitpunkten

Zeitpunkt	t = 0 h		t = 24 h	
Methode	quanti- tativ	semi- quanti- tativ	quanti- tativ	semi- quanti- tativ

a) Lagerung bei +4° C

mittlere Keim- zahl/ml MM	$2,3 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$
Standard- abweichung	$\pm 3,2 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,3 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$
Probenzahl	30	30	29	29
mittlere Keim- zahl/ml Col.	$1,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^3$	$4,7 \cdot 10^3$
Standard- abweichung	$\pm 1,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,7 \cdot 10^4$	$\pm 7,2 \cdot 10^3$	$\pm 4,6 \cdot 10^3$
Probenzahl	12	12	12	12

b) Lagerung bei -18° C

mittlere Keim- zahl/ml MM	$2,3 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
Standard- abweichung	$\pm 3,2 \cdot 10^4$	$\pm 3,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,6 \cdot 10^4$	$\pm 3,4 \cdot 10^4$
Probenzahl	30	30	28	28
mittlere Keim- zahl/ml Col.	$1,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$
Standard- abweichung	$\pm 1,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,7 \cdot 10^4$	$\pm 1,5 \cdot 10^4$	$\pm 2,8 \cdot 10^4$
Probenzahl	12	12	11	11

t = 48 h

t = 72 h

quanti-
tativ

semi-
quanti-
tativ

quanti-
tativ-

semi-
quanti-
tativ

$1,2 \cdot 10^4$

$1,1 \cdot 10^4$

$8,2 \cdot 10^3$

$7,4 \cdot 10^3$

$1,8 \cdot 10^4$

$\pm 2,5 \cdot 10^4$

$1,3 \cdot 10^4$

$1,8 \cdot 10^4$

29

29

29

29

$2,9 \cdot 10^3$

$3,0 \cdot 10^3$

$2,0 \cdot 10^3$

$2,2 \cdot 10^3$

$\pm 3,5 \cdot 10^3$

$\pm 4,2 \cdot 10^3$

$\pm 2,6 \cdot 10^3$

$\pm 3,6 \cdot 10^3$

12

12

12

12

t = 48 h

t = 7 Tage

t = 28 Tage

quanti-
tativ

semi-
quanti-
tativ

quanti-
tativ

semi-
quanti-
tativ

quanti-
tativ

semi-
quanti-
tativ

$2,0 \cdot 10^4$

$1,9 \cdot 10^4$

$2,1 \cdot 10^4$

$2,0 \cdot 10^4$

$2,2 \cdot 10^4$

$2,1 \cdot 10^4$

$\pm 2,6 \cdot 10^4$

$3,3 \cdot 10^4$

$\pm 2,5 \cdot 10^4$

$\pm 3,4 \cdot 10^4$

$\pm 2,8 \cdot 10^4$

$\pm 3,4 \cdot 10^4$

28

28

27

27

26

26

$1,2 \cdot 10^4$

$1,3 \cdot 10^4$

$1,3 \cdot 10^4$

$1,5 \cdot 10^5$

$1,2 \cdot 10^4$

$1,6 \cdot 10^4$

$\pm 1,6 \cdot 10^4$

$\pm 3,0 \cdot 10^4$

$\pm 1,8 \cdot 10^4$

$\pm 3,2 \cdot 10^4$

$\pm 1,7 \cdot 10^4$

$\pm 3,1 \cdot 10^4$

10

10

9

9

9

9

2. Verhalten der Bakterienzahl unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Um die Auswirkungen von verschiedenen Lagerungsbedingungen auf den Keimgehalt der Muttermilch noch weiter zu untersuchen, wurden Proben bei Raumtemperatur, bei $+4^{\circ}\text{C}$ und bei -18°C gelagert. Zu verschiedenen Zeiten wurde dann die Bakterienzahl/ml Milch bestimmt. Dabei ergab sich bei Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ über 72 h eine rechnerisch signifikante ($p \leq 0,001$), wenn auch für die Praxis nicht bedeutsame Abnahme der Keimzahl in fast allen Milchproben.

Tabelle 14 a zeigt die Mittelwerte der Keimzahlen in den 42 Milchproben, die sich aus 12 Colostrum- und 30 Muttermilchproben zusammensetzen, zu den verschiedenen Zeiten. In Abbildung 17 sind diese Ergebnisse für Muttermilch und Colostrum graphisch dargestellt.

Es konnte kein Unterschied im Verhalten potentiell pathogener und nicht pathogener Keime bei diesen Lagerungsbedingungen festgestellt werden. Beide zeigten eine Tendenz zur Abnahme. Beim Vergleich des Bakteriengehalts der Muttermilchproben mit denen der Colostrumproben über 72 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ fiel eine etwas stärkere Abnahme der Keimzahl in den Colostrumproben auf, wie aus den Tabellen 14 b und 14 c hervorgeht. Sie enthalten die Mittelwerte der Bakterienzahlen für Colostrum und Muttermilch (siehe auch Abbildung 17). Die Keimzahlen jeder einzelnen Probe zu den entsprechenden Zeiten sind aus den Abbildungen 19 a und 19 b zu entnehmen. Die Lagerung bei -18°C dagegen ergab über einen Zeitraum von 28 Tagen keine Änderung des Keimgehaltes in der Milch. Wie aus den Tabellen 15 a, 15 b und 15 c und Abbildung 18, die die Mittelwerte der einzelnen Bakterienzahl/ml Milch für jeden Zeitpunkt enthalten, ersichtlich ist, bleibt der Keimgehalt in allen Proben relativ konstant.

Tabelle 14 a Mittelwerte der Keimzahlen in den 42 Milchproben nach Lagerung bei +4° C

Bestimmungs- zeitpunkt	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
mittlere Keim- zahl/ml Milch	$1,9 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^3$	$6,4 \cdot 10^3$
Standard- abweichung	$\pm 2,8 \cdot 10^4$	$\pm 2,0 \cdot 10^4$	$\pm 1,6 \cdot 10^4$	$\pm 1,2 \cdot 10^4$
Probenzahl	42	41	41	41

Tabelle 14 b Mittelwerte der Keimzahlen in 30 Muttermilchproben nach Lagerung bei +4° C

Bestimmungs- zeitpunkt	t = 0	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
mittlere Keim- zahl/ml MM	$2,3 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$8,2 \cdot 10^3$
Standard- abweichung	$3,1 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^4$
Probenzahl	30	29	29	29

Tabelle 14 c Mittelwerte der Keimzahlen aus 12 Colostrumproben nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$

Bestimmungs- zeitpunkt	t = 0	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
mittlere Keim- zahl/ml Milch	$1,2 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
Standard- abweichung	$\pm 1,6 \cdot 10^4$	$\pm 7,2 \cdot 10^3$	$\pm 3,5 \cdot 10^3$	$\pm 2,6 \cdot 10^3$
Probenzahl	12	12	12	12

Die Einzelwerte für jede Bestimmung sind in den Abbildungen 20 a und b graphisch dargestellt.

Da aus praktischen Gründen die Muttermilch nach Entnahme aus dem Kühlschrank bzw. Tiefkühlfach kurze Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden muß, wurden noch weitere Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Die Aufbewahrung frischer Milch für 2 h bei Raumtemperatur führte zu keiner Veränderung der Bakterienzahl, wie die Mittelwerte der Keimzahlbestimmungen in Tabelle 16 und Abbildung 21 zeigen. Auch die Lagerung der 24 h tiefgefrorenen Milch für 2 h bei Raumtemperatur und für 24 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ wies nach erneuter bakteriologischer Untersuchung keine signifikante Abweichung des Keimgehaltes vom Ausgangswert auf. In Tabellen 17 und 18 sind wieder die Mittelwerte der Bakterienzahlen zu den entsprechenden Bedingungen aufgeführt. Eine graphische Darstellung geben die Abbildungen 22 und 23 wieder. Diese Untersuchungen sprechen dafür, daß zunächst tiefgefrorene, aufgetaute Milch noch über einen Zeitraum von 24 h im Kühlschrank aufbewahrt werden kann und die Lagerung der Milch bei Raumtemperatur bis zu 2 h ebenfalls relativ unbedenklich ist.

Tabelle 15 a Mittlere Bakterienzahl der 42 Milchproben
nach Lagerung bei -18°C

Bestim- mungszeit- punkt	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t=7 Tage	t=28 Tage
mittlere Keimzahl/ ml Milch	$1,9 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$
Standard- abwei- chung	$\pm 2,8 \cdot 10^4$	$\pm 2,3 \cdot 10^4$	$\pm 2,4 \cdot 10^4$	$\pm 2,4 \cdot 10^4$	$\pm 2,6 \cdot 10^4$
Proben- zahl	42	39	38	36	35

Tabelle 15 b Mittlere Bakterienzahl der 30 Muttermilch-
proben nach Lagerung bei -18°C

Bestim- mungszeit- punkt	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t=7 Tage	t=28 Tage
mittlere Keimzahl/ ml MM	$2,2 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$
Standard- abwei- chung	$\pm 3,1 \cdot 10^4$	$\pm 2,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,5 \cdot 10^4$	$\pm 2,8 \cdot 10^4$
Proben- zahl	30	28	28	27	26

Tabelle 15 c Mittlere Bakterienzahl der 12 Colostrum-
proben nach Lagerung bei -18°C

Bestim- mungszeit- punkt	t = 0 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 7 Tage	t = 28 Tage
--------------------------------	---------	----------	----------	------------	-------------

mittlere Keimzahl/ml Colostrum	$1,2 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$
Standard- abwei- chung	$\pm 1,6 \cdot 10^4$	$\pm 1,5 \cdot 10^4$	$\pm 1,6 \cdot 10^4$	$\pm 1,8 \cdot 10^4$	$\pm 1,7 \cdot 10^4$
Proben- zahl	12	11	10	9	9

Tabelle 16 Mittelwerte der Keimzahlbestimmung aus frischer
Muttermilch und nach Lagerung bei Raumtempera-
tur für 2 h

Bestimmungs- zeitpunkt	t = 0 h	t = 2 h bei $+24^{\circ}\text{C}$
---------------------------	---------	-----------------------------------

mittlere Keim- zahl/ml MM	$1,3 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$
Standard- abweichung	$\pm 2,5 \cdot 10^4$	$\pm 2,2 \cdot 10^4$
Probenzahl	26	26

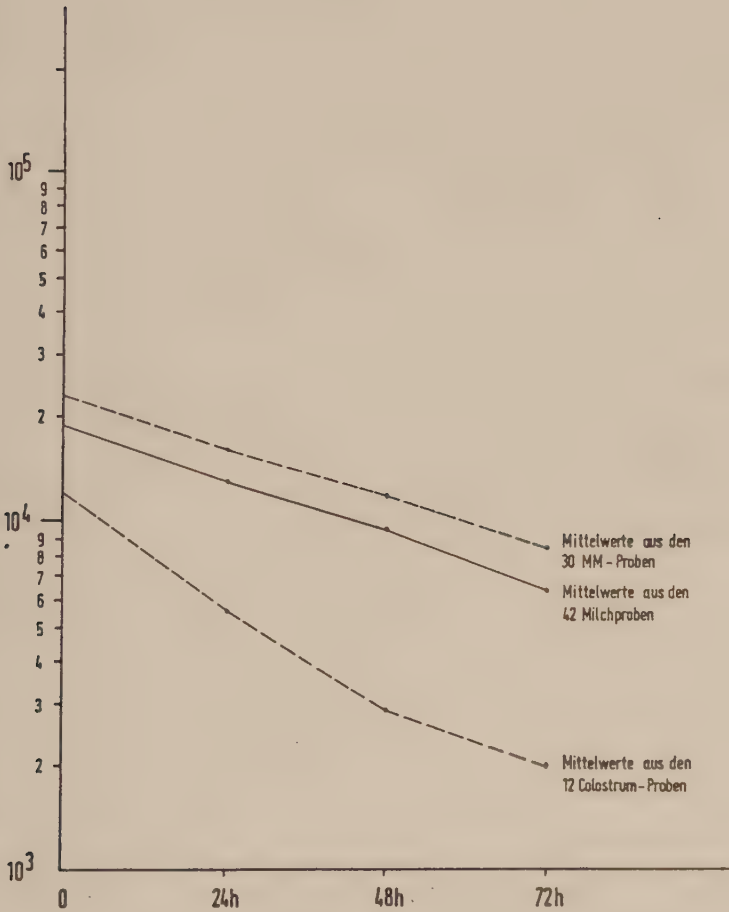


Abbildung 17 Mittelwerte der Keimzahlen in den Muttermilchproben zu den verschiedenen Bestimmungszeiten nach Lagerung bei +4° C

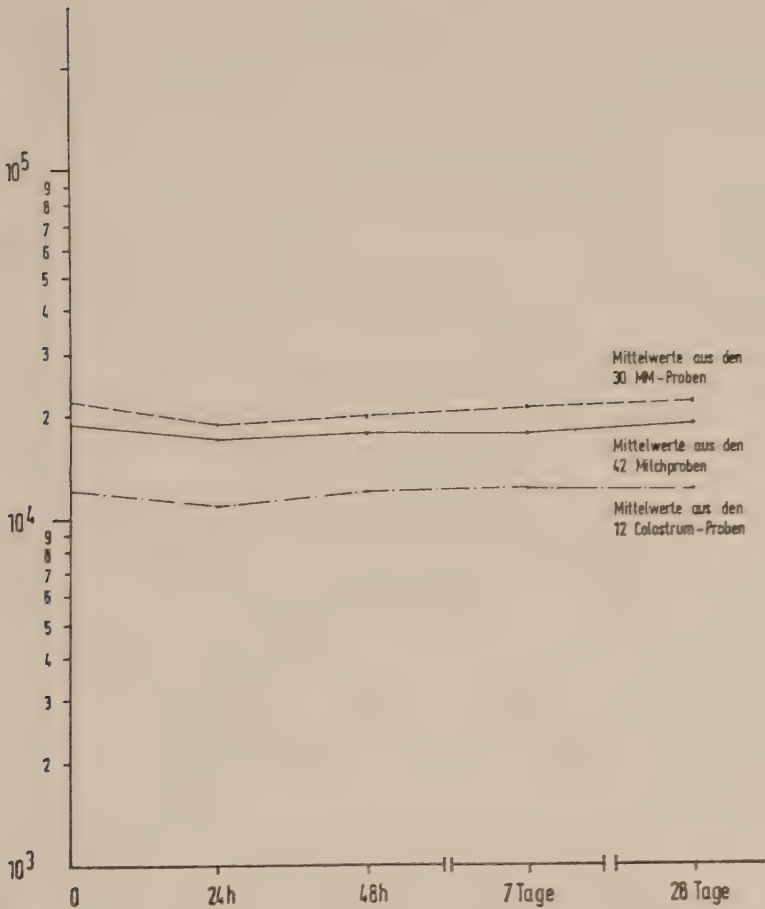


Abbildung 18 Mittelwerte der Keimzahlen in den Milchproben zu den verschiedenen Bestimmungszeiten nach Lagerung bei -18° C

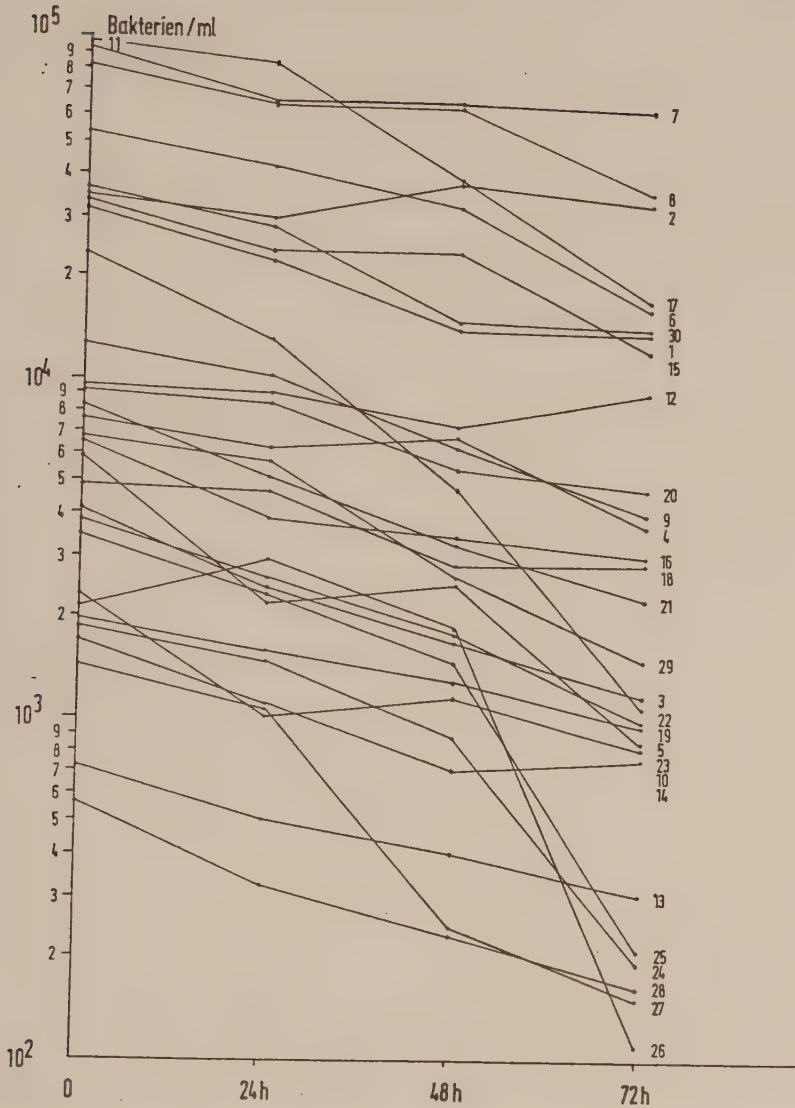


Abbildung 19 a Bakterienzahl in den Muttermilchproben zu den verschiedenen Bestimmungszeiten nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$

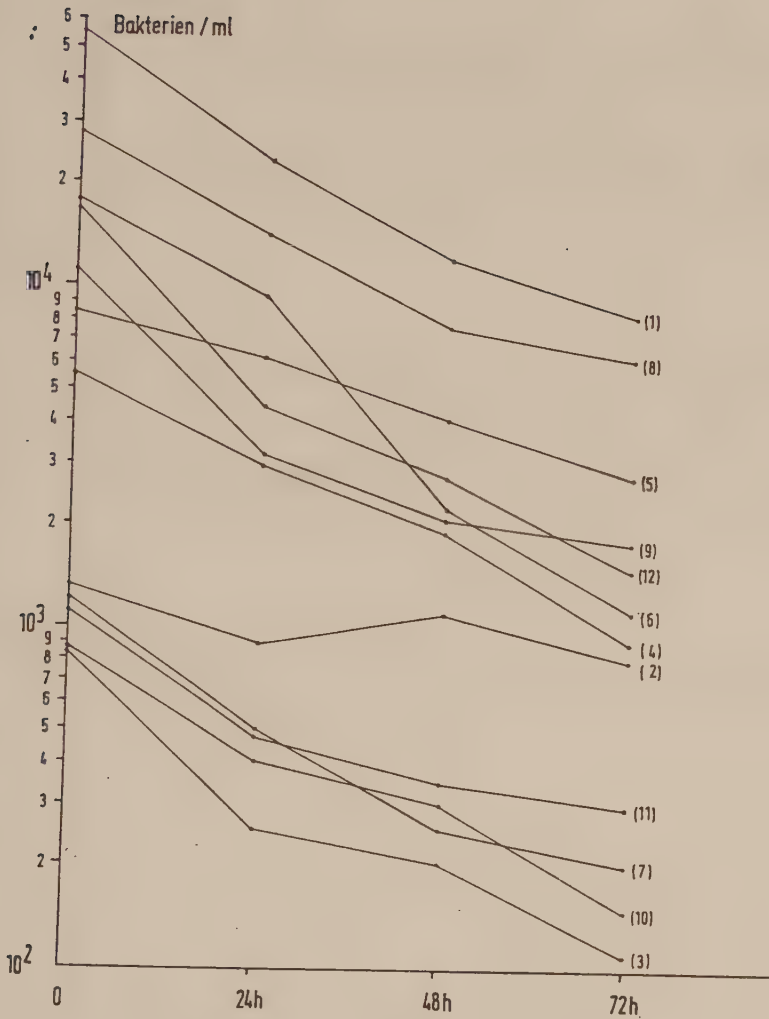


Abbildung 19 b Bakterienzahl in den Colostrumproben zu den verschiedenen Bestimmungszeiten nach Lagerung bei +4° C

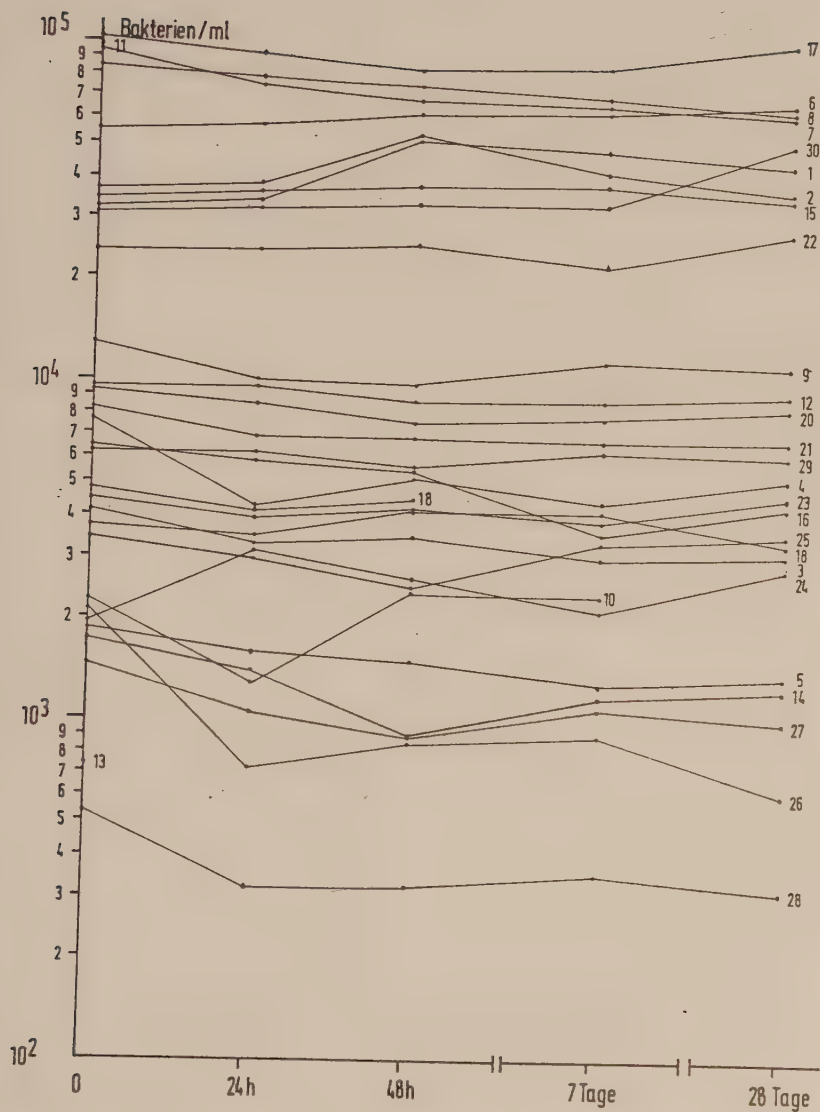


Abbildung 20 a Bakterienzahl in den Muttermilchproben zu den verschiedenen Bestimmungszeiten nach Lagerung bei -18°C

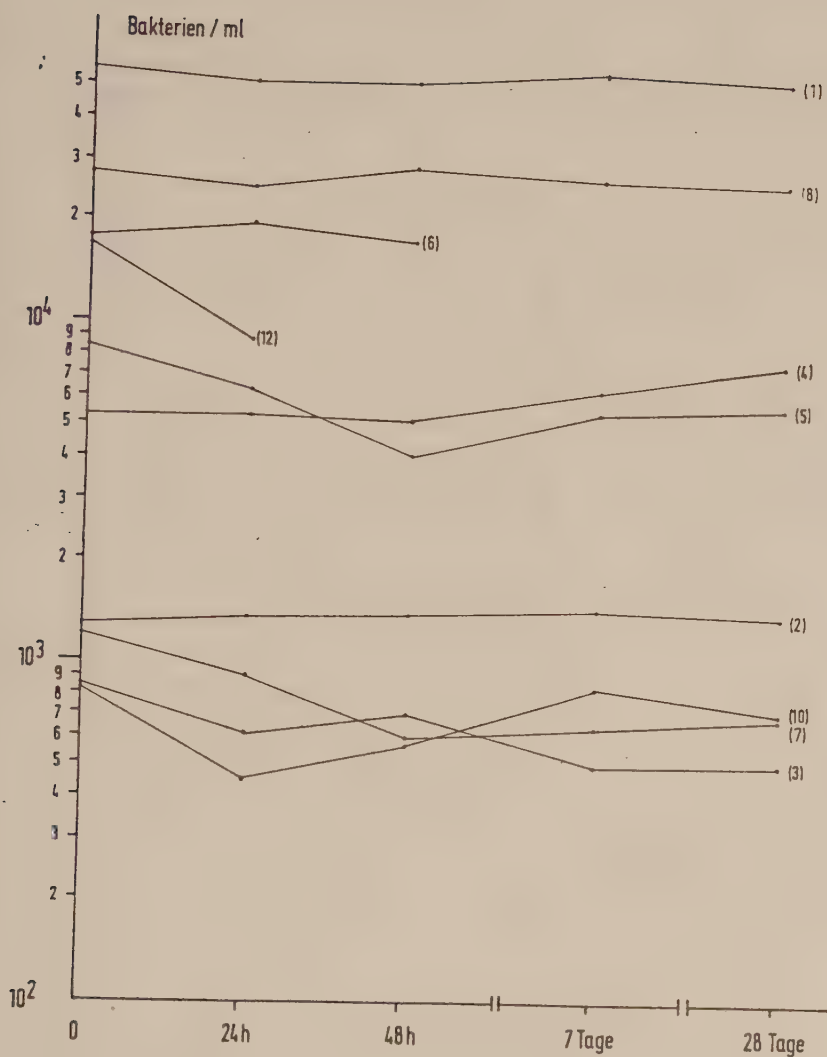


Abbildung 20 b Bakterienzahl in den Colostrumproben zu den verschiedenen Bestimmungszeiten nach Lagerung bei -18°C

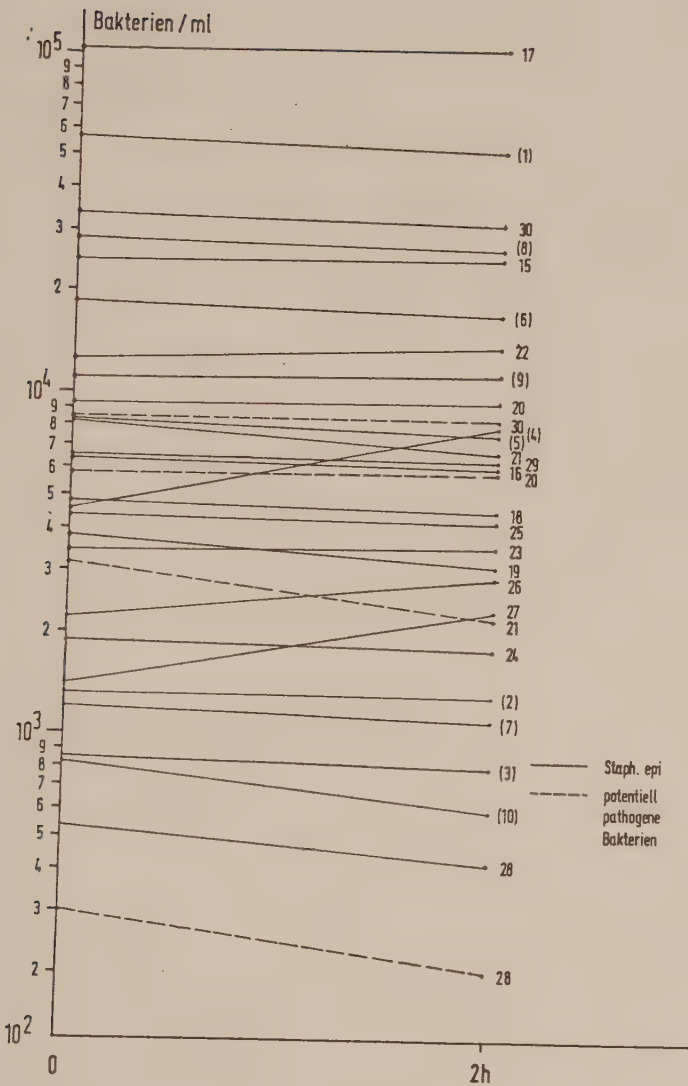


Abbildung 21 Bakterienzahl der frischen Milch und nach Lagerung bei Raumtemperatur über 2 h

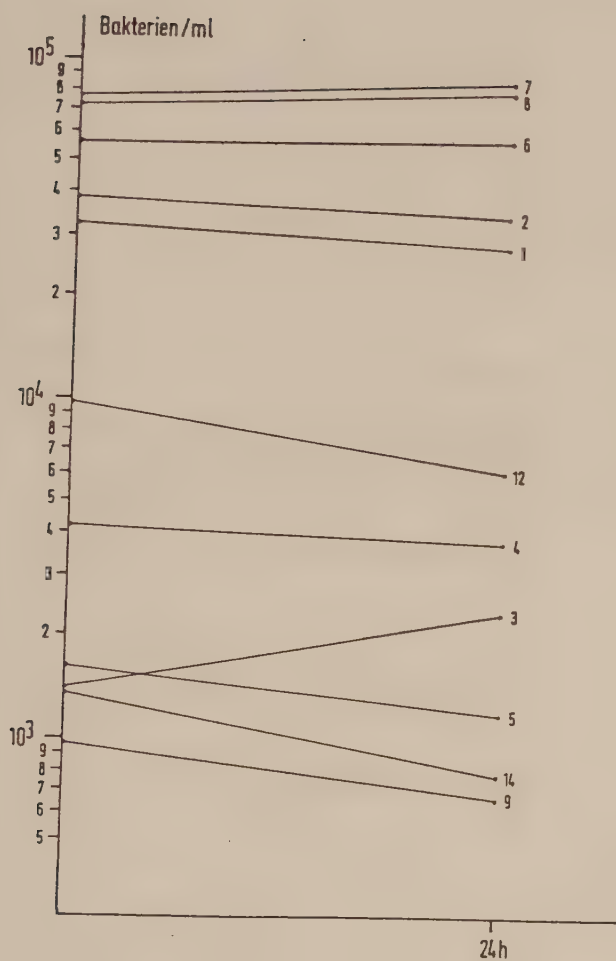


Abbildung 22 Bakterienzahl in den 24 h tiefgefrorenen Milchproben a) sofort nach dem Auftauen
b) nach 24 h Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$

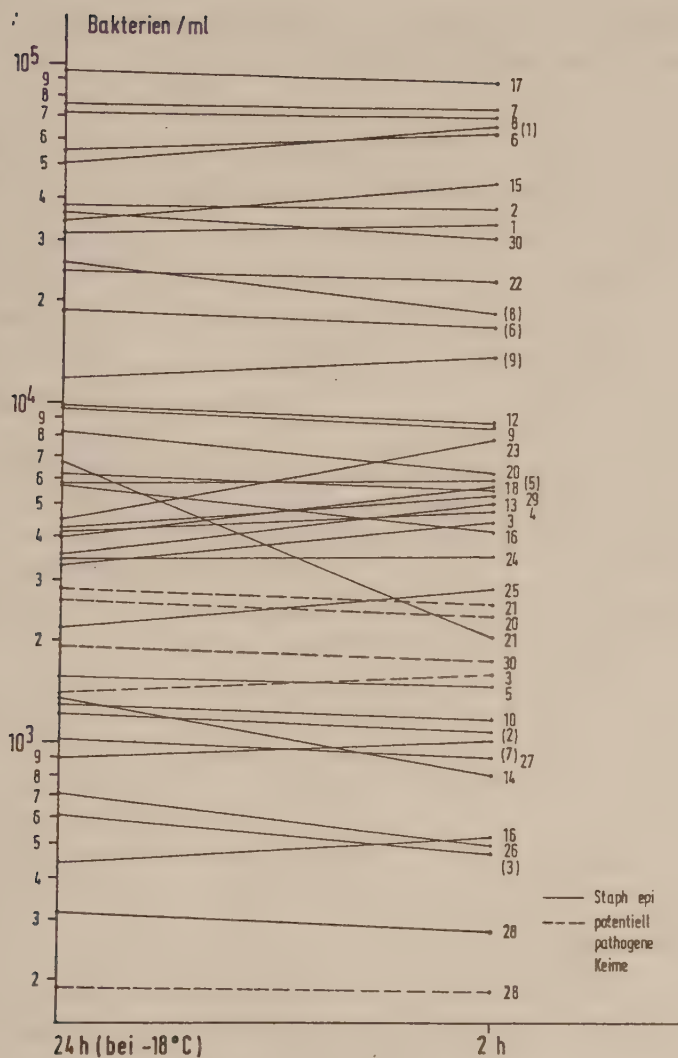


Abbildung 23 Bakterienzahl in der 24 h tiefgefrorenen Muttermilch bzw. Colostrum sofort nach dem Auftauen und nach 2 h Lagerung bei Raumtemperatur

Tabelle 17 Mittlere Bakterienzahl der 24 h tiefgefrorenen Milch nach weiteren 2 h Lagerung bei Raumtemperatur

Zeit	$t = 0 \text{ h}^{1)}$	$t = 2 \text{ h}^{2)}$
mittlere Keimzahl/ml MM	$1,7 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
Standardabweichung	$\pm 2,3 \cdot 10^4$	$\pm 2,4 \cdot 10^4$
Probenzahl	38	38

1) Bestimmung der Bakterienzahl unmittelbar nach dem Auftauen der Milchproben nach 24 h Lagerung bei -18°C

2) Diese Bestimmung erfolgte nach 2 h Lagerung dieser aufgetauten Milch bei $+24^\circ \text{C}$

Tabelle 18 Mittlere Bakterienzahl der 24 h tiefgefrorenen Milch (t_1) nach weiteren 24 h Lagerung bei $+4^\circ \text{C}$

Zeit	$t_1 = 24 \text{ h bei } -18^\circ \text{C}^{1)}$	$t_2 = 24 \text{ h bei } +4^\circ \text{C}^{2)}$
mittlere Keimzahl/ml MM	$3,1 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$
Standardabweichung	$\pm 2,6 \cdot 10^4$	$\pm 2,8 \cdot 10^4$
Probenzahl	11	11

1) Bestimmung der Bakterienzahl unmittelbar nach Auftauen der 24 h tiefgefrorenen Milchproben

2) Bestimmung der Bakterienzahl nach weiteren 24 h Lagerung dieser Milchproben bei $+4^\circ \text{C}$

3. Auswirkung verschiedener Lagerungsbedingungen auf bakterielle Kontamination von Muttermilch

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen in erster Linie das Verhalten grampositiver Bakterien in der Muttermilch unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Um zu prüfen, ob diese Ergebnisse auch für gramnegative Keime (durch die Neugeborene oder Säuglinge in besonderem Maße gefährdet sein können) gelten, wurden 14 Milchproben mit einem potentiell pathogenen Stamm von *E. coli* (ATCC 25 922) beimpft und entsprechend aufbewahrt. Zur Beimpfung wurden verschiedene Ausgangstiters von *E. coli* benutzt. Die Lagerung der mit *E. coli* beimpften Milch bei $+4^{\circ}\text{C}$ für 72 h führte zu einer rechnerisch signifikanten ($p \leq 0,001$) Abnahme des *E. coli*-Titers. *E. coli* zeigt somit ein ähnliches Verhalten wie der ebenfalls in den Milchproben vorhandene *Staphylococcus epidermidis*, was aus Tabelle 19, die die Mittelwerte der einzelnen Keimzahlbestimmungen enthält, hervorgeht. Auch aus Abbildung 24 ist die Tendenz der Abnahme des *E. coli*-Titers in jeder Probe über einen Zeitraum von 72 h ersichtlich. Die Keimzahl ist in keiner Probe angestiegen.

Im Gegensatz zur Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ zeigt *E. coli* bei -18°C Lagerung für 7 Tage ein anderes Verhalten als *Staphylococcus epidermidis*. Während die Keimzahlen von *Staphylococcus epidermidis* keine signifikante Abweichung ($p > 0,05$) vom Ausgangswert zeigen, nimmt der *E. coli*-Titer ab ($p \leq 0,001$). Abbildung 25 zeigt dieses Verhalten in den einzelnen Milchproben. Auch Tabelle 20, die die mittleren Bakterienzahlen der mit *E. coli* beimpften Milchproben nach Lagerung bei -18°C enthält, gibt dies wieder.

Möglicherweise ist die etwas größere Sensitivität von gramnegativen Bakterien gegenüber tiefer Lagerungstemperatur durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand bedingt. Generell läßt sich aber sagen, daß keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten grampositiver und gramnegativer Keime bei den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen gefunden werden konnten.

Die H^+ -Ionenkonzentration lag bei allen untersuchten Milchproben im alkalischen Bereich, d. h. einem $pH > 7,0$.

Tabelle 19 Mittlere Bakterienzahl in den 14 mit E. coli beimpften Milchproben zu verschiedenen Zeiten nach Lagerung bei $+4^{\circ} C$

Zeit	E. coli/ml Milch		Staph. epi/ml Milch	
	Mittelwert $\pm$ SA		Mittelwert $\pm$ SA	
	$7,6 \cdot 10^3$	$\pm 4,0 \cdot 10^3$ ¹⁾	$2,4 \cdot 10^4$	$\pm 2,5 \cdot 10^4$
24 h	$4,5 \cdot 10^3$	$\pm 2,7 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^4$	$\pm 1,9 \cdot 10^4$
48 h	$3,5 \cdot 10^3$	$\pm 2,4 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^4$	$\pm 1,8 \cdot 10^4$
72 h	$2,3 \cdot 10^3$	$\pm 2,1 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^4$	$\pm 1,5 \cdot 10^4$

1) mittlere Bakterienzahl der frisch gewonnenen Muttermilchproben

Tabelle 20 Mittlere Bakterienzahl in den 11 mit E. coli
beimpften Milchproben zu verschiedenen Zeiten
und Lagerung bei -18°C

Zeit	E. coli/ml Milch		Staph. epi/ml Milch	
	Mittelwert	$\pm$ SA	Mittelwert	$\pm$ SA
	$7,7 \cdot 10^3$	$\pm 3,8 \cdot 10^3$ ¹⁾	$2,7 \cdot 10^4$	$\pm 2,9 \cdot 10^4$
24 h	$5,1 \cdot 10^3$	$\pm 3,4 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^4$	$\pm 2,7 \cdot 10^4$
7 Tage	$3,5 \cdot 10^3$	$\pm 3,3 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^4$	$\pm 2,6 \cdot 10^4$

1) mittlere Bakterienzahl der frisch gewonnenen Muttermilchproben

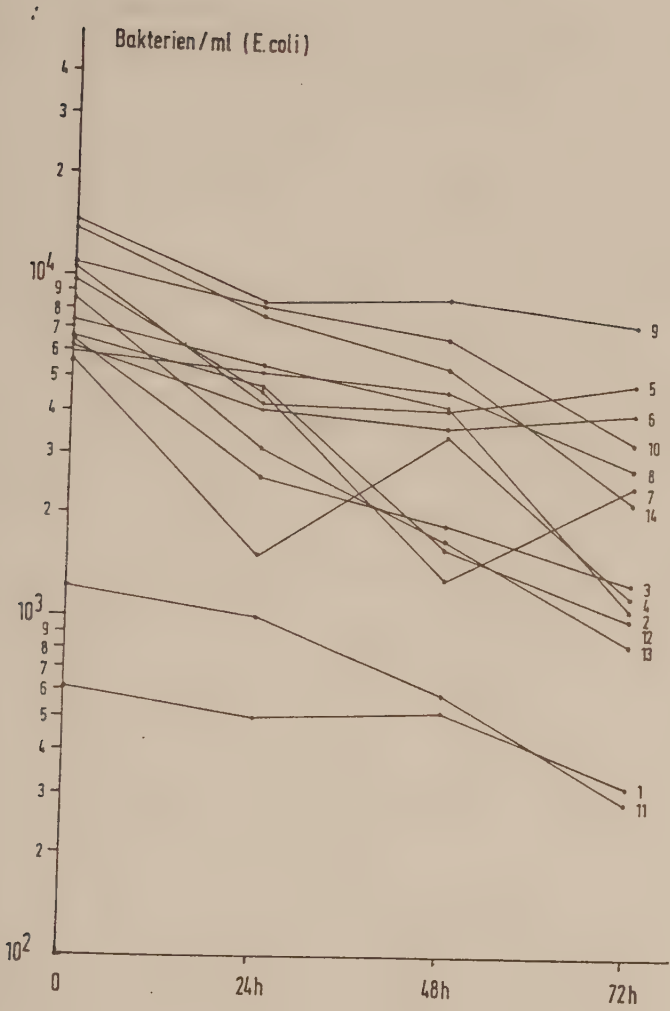


Abbildung 24 Bakterienzahl in den 14 mit E. coli beimpften Milchproben zu verschiedenen Zeiten nach Lagerung bei +4° C

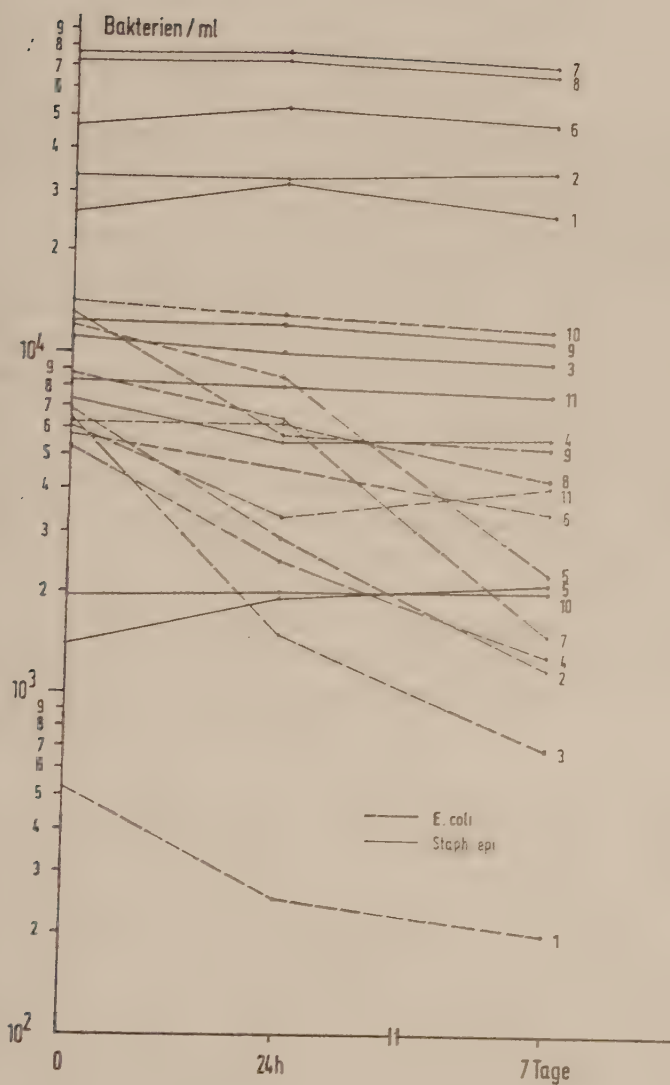


Abbildung 25 Bakterienzahl/ml in den 11 mit *E. coli* beimpften Milchproben zu verschiedenen Zeiten nach Lagerung bei -18°C

IV. Diskussion

Eine herkömmliche Methode, um Muttermilch, die nicht sofort an den Säugling verfüttert werden kann, keimarm eine gewisse Zeit lang aufzubewahren, besteht in Hitzebehandlung der Milch, z. B. Pasteurisieren oder Kochen. Die negativen Auswirkungen dieser Verfahren auf die Qualität der MM, insbesondere ihre immunprotektiven Eigenschaften, wurden in der Einleitung ausführlich dargestellt. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch Lagerung von MM bei $+4^{\circ}\text{C}$ (im Kühlschrank) bzw. bei -18°C (im Tiefkühlfach)-Verfahren, die sich problemlos in die Praxis umsetzen lassen - bakterielle Unbedenklichkeit gewährleistet werden kann, ohne dabei die negativen Folgen der Hitzebehandlung in Kauf nehmen zu müssen. Die Untersuchungen umfassen Beobachtungen der Leukozytenzahl und des Immunglobulingehaltes einerseits und des Bakterientiters in der MM andererseits unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Teilaspekte dieser Arbeit decken sich mit bereits publizierten Untersuchungen. Darauf wird im Diskussionszusammenhang eingegangen.

Um den Einfluß der verschiedenen Lagerungsbedingungen auf die Leukozyten zu untersuchen, wurden zunächst die Leukozytenzahlen frischer Colostrum- bzw. Muttermilchproben ermittelt. Sie lagen im Durchschnitt für die Colostrumproben bei 4×10^6 Zellen/ml, während bei den Muttermilchproben ein etwas niedrigerer Wert von $9,5 \times 10^5$ Zellen/ml gefunden wurde. Allerdings ließen sich große individuelle Unterschiede in der Leukozytenzahl verschiedener Colostrum- bzw. Muttermilchproben feststellen. Zum Teil liegt dies an der unterschiedlichen Laktationsdauer zum Zeitpunkt der Milchgewinnung. So ließ sich generell beobachten, daß mit zunehmender Laktationsdauer die Leukozy-

tenzahl/ml MM abnimmt. Dagegen steigt das täglich produzierte Milchvolumen von einigen Millilitern auf über 500 ml/Tag an. Dadurch bleibt die durch den Säugling aufgenommene Zellzahl relativ konstant. Die ermittelten Konzentrationen der Leukozyten in Colostrum- und Muttermilchproben, wie auch ihre relative Abnahme während zunehmender Laktationsdauer stehen in guter Übereinstimmung mit Angaben der Literatur (9, 41, 67, 69, 73, 76, 92).

Während der Anteil vitaler Leukozyten in frischer MM ca. 94 % beträgt, was auch Ahlstedt et al. (1975) bestätigen (1), geht er nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ über 72 h auf 52 %, also ungefähr die Hälfte, zurück. Pittard et al. (1981) fanden übereinstimmende Werte (75). Lagerung bei -18°C reduziert dagegen den Anteil vitaler Leukozyten schon nach 24 h auf 33,4 %. Fortdauernde Lagerung bei -18°C führt zu einer weiteren Reduktion. Nach 28 Tagen werden nur noch 8,2 % vitale Zellen gefunden, wobei allerdings fraglich ist, ob es sich dabei tatsächlich um im biologischen Sinne noch vitale Zellen handelt, da über die Auflösengenauigkeit der angewandten Bestimmungsmethode nichts bekannt ist (7).

Wie diese Ergebnisse und Ergebnisse anderer Autoren (16, 53, 71, 76, 92) zeigen, führen beide Lagerungsbedingungen zu einer Inaktivierung der Leukozyten in der MM. Allerdings ist dieser Effekt bei Lagerung bei -18°C wesentlich ausgeprägter als bei Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$. Darüberhinaus haben Untersuchungen von Mandyla et al. (1981) gezeigt, daß Milchleukozyten durch Tiefrieren innerhalb von 24 h ihre Fähigkeit zur Phagozytose und zur antikörperabhängigen Zytotoxizität verlieren, während dieses Potential bei Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ erhalten bleibt (53). In Hinblick auf die Leukozyten erweist sich also Lagerung von Muttermilchproben bei $+4^{\circ}\text{C}$ wesentlich schonender als Lagerung bei -18°C .

Neben den Leukozyten tragen vor allem die in der MM vorhandenen Immunglobuline zu den infektionsverhütenden Eigenschaften der MM bei. Wie aus anderen Arbeiten bekannt ist, finden sich sowohl im Colostrum als auch in der MM alle Immunglobulinklassen (IgA, IgG, IgM, IgD und IgE) (33, 67, 92). Das vorherrschende Immunglobulin der MM ist aber das IgA, das zu 90 % aus dem sekretorischen IgA (S-IgA) besteht (59, 68, 72). S-IgA liegt als Dimer vor, bestehend aus 2 Monomeren IgA, die dem Serum - IgA entsprechen und durch ein Polypeptid, der sogenannten J-Kette verbunden sind. Außerdem besitzt dieses Molekül eine sekretorische Komponente, die es widerstandsfähiger gegen pH-Änderungen und proteolytische Enzyme des Verdauungstraktes macht (75).

Da IgD und IgE nur einen sehr geringen Teil der in der MM vorhandenen Immunglobuline stellen, beschränkt sich die vorliegende Arbeit darauf, den Einfluß der Temperatur auf die Stabilität von IgA, IgG und IgM zu untersuchen. Die Konzentrationen der Immunglobuline im frischgewonnenen Colostrum betrugen im Mittel 477,4 mg/dl für IgA, 14,5 mg/dl für IgG und 60,6 mg/dl für IgM. Während die IgA-Konzentration des Colostrums deutlich höher als im mütterlichen Serum ist, gleicht die IgM-Konzentration in etwa den Serumwerten. Demgegenüber liegt die IgG-Konzentration des Colostrums deutlich niedriger als im mütterlichen Serum.

Während der ersten Woche der Laktation konnte eine deutliche Abnahme der relativen Konzentration aller Immunglobuline festgestellt werden, die dann allerdings ein Plateau erreichte und in der Folgezeit unverändert blieb. In der MM betrug die Konzentration an IgA im Mittel noch 109,2 mg/dl, an IgG im Mittel 4,8 mg/dl und an IgM im Mittel noch 15,8 mg/dl. Damit sank die jeweilige Immunglobulinkonzentration in der MM auf ein Viertel der im Colostrum gefundenen Werte.

Während die in der Literatur angegebenen Werte ebenfalls die höhere Konzentration von IgA, IgG und IgM im Colostrum, sowie die Abnahme der Immunglobulinkonzentration während der ersten Woche der Laktation bestätigen (2, 17, 32, 35, 58, 78, 93), gibt es starke Schwankungen, was die Absolutwerte der IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen betrifft (2, 17, 32, 51, 59, 72, 78, 91). Mehrere Gründe können für diese Schwankungen in Frage kommen. So wurden zum Teil unterschiedliche Techniken wie Mikroimmunelektrophorese und Immundiffusion (79), ELISA-Test (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (1, 17), "reverse passive haemagglutination test (RPH) (93), "fluorescent immunosorbent assay" (31, 32), "double antibody radioimmunoassay" (35), Elektroimmunoassay (25) und einfache radiale Immundiffusion (2, 27, 51, 68, 72, 74, 78, 91) wie in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentration eingesetzt. Zahlreiche Bestimmungen wurden darüber hinaus an entfetteter Milch (17, 27, 51, 58, 59, 68, 91, 93) bzw. mit Hilfe S-IgA spezifischer Antikörper durchgeführt (17, 31, 32, 68, 78). Beide Maßnahmen mögen sich auf die Immunglobulinkonzentration auswirken.

Wie die vorgelegten Ergebnisse zeigen, werden die in den Ausgangsproben festgestellten Immunglobulinkonzentrationen weder durch Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 72 h noch durch Lagerung bei -18°C über 28 Tage verändert.

Björkstén et al. (1980) und Evens et al. (1978), die den Einfluß des Tieffrierens auf die Immunglobulinkonzentration untersuchten, kamen zu gleichartigem Ergebnis (10, 25). Dagegen fanden Sunshine et al. (1980), Gibbs, J. H. et al. (1977) und Liebhaber et al. (1977) nur die Stabilität von IgA unter diesen Bedingungen, berichten jedoch von einer Reduktion der IgG- und IgM-Konzentration (30, 51, 92). Die Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind unklar.

Unabhängig davon erweisen sich jedoch beide Lagerungsmethoden günstiger als Verfahren, die eine Hitzebehandlung der Milch mit einschließen. Björkstén et al. (1980) zeigte in seinen Untersuchungen auch, daß eine Lagerungstemperatur von -20°C über 3 Monate die Konzentration von Laktoferrin, Eisenbindungs-kapazität, Lysozym, C 3, d_1 -Antitrypsin unbeeinflusst lassen (10).

Wie die diskutierten Ergebnisse zeigen, werden die immunprotektiven Eigenschaften durch Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -18°C in wesentlich höherem Maße bewahrt als bei Verfahren, die eine Pasteurisation der MM mit einschließen. Um die Eignung dieser Lagerungsbedingungen für die Aufbewahrung von MM-Proben zu bewerten, muß jedoch auch ihr Einfluß auf bakterielle Kontamination der MM - die Hauptgefahr für den Säugling - untersucht werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten bakteriologischen Analysen von Colostrum- und Muttermilchproben hatten mehrere Aspekte. Zunächst sollte eine quantitative und qualitative Bestandsaufnahme der in frischen MM-Proben vorhandenen Keime durchgeführt werden, um festzustellen, inwieweit die Ausgangsproben als bakteriologisch unbedenklich angesehen werden können. Zum zweiten sollte - wie im Falle des Leukozyten- und Immunglobulingehalts - die Auswirkung der Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ und -18°C auf die in der MM vorhandenen Keime untersucht werden. Da es sich bei den in frischer MM bzw. Colostrum vorhandenen Bakterien mehrheitlich um grampositive Hautkeime handelt, wurde schließlich durch Beimpfung eines Teils der MM-Proben auch untersucht, wie sich Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -18°C auf eine eventuelle Verunreinigung mit gramnegativen Bakterien, die für den Säugling besonders bedrohlich ist, auswirken. Durch Versuche, die die Beimpfung von MM-Proben mit gramnegativen Keimen beinhalten, sollte außerdem herausgefunden werden, ob bakterielle Kontamination die Qualität der MM auch indirekt durch Herabsetzung der Leukozytenzahl bzw. des Immunglobulingehaltes beeinträchtigt.

Der Diskussion quantitativer und qualitativer Analysen der in der MM vorhandenen Keime sollte noch vorausgeschickt werden, daß es unterschiedliche Meinungen gibt, unter welchen Voraussetzungen MM-Proben als bakteriologisch bedenklich zu bezeichnen sind (4, 14, 19, 23, 42, 44, 61). So orientieren sich R. Schwarz und O. H. Braun an der "Verordnung über diätetische Lebensmittel" vom 20.06.1963 in der Fassung vom 10.05.1976(87). Danach darf die Absolutkeimzahl der in Muttermilch- bzw. Colostrumproben vorhandenen Keime einen Titer von 10^4 /ml nicht überschreiten, coliforme Keime dürfen sich in 0,1 ml der Proben nicht nachweisen lassen. Da aber Milchproben, auch wenn sie mit großer Sorgfalt gewonnen werden, häufig eine größere Keimzahl als 10^4 /ml aufweisen, empfehlen verschiedene Autoren (10, 14, 87) zur Verfütterung auch rohe MM bzw. Colostrum mit einem Bakterientiter bis zu 10^5 /ml zuzulassen, sofern sie unter qualitativen Gesichtspunkten als bakteriologisch einwandfrei zu bezeichnen ist. Doch auch im Hinblick auf die Bewertung der qualitativen Analysen gibt es unterschiedliche Ansichten. Einigkeit besteht darüber, daß der Nachweis gramnegativer Darmkeime eine grundsätzliche Gefährdung des Säuglings bedeutet und daß die entsprechenden MM-Proben daher nicht roh verfüttert werden dürfen (11, 14, 19, 87). Während zahlreiche Autoren auch die Kontamination von MM bzw. Colostrum durch pyogene Staphylokokken für grundsätzlich bedenklich halten, haben manche Autoren (11, 14, 19, 52, 87) ihre Bedenken gegen die Verfütterung von Milch, die eine geringe Menge an Staphylococcus aureus ($< 10^2$ /ml) enthält, aufgegeben (10, 87, 99). Sie stützen ihre Argumente zum einen darauf, daß diese Keime häufig von der Haut der Mutter stammen und somit auch beim natürlichen Saugvorgang vom Kind mit aufgenommen werden. Zum anderen wird darauf verwiesen, daß bei oraler Applikation eine pyogene Infizierung durch Staphylococcus aureus nicht zu erwarten ist,

jedoch kann eine Bildung von Enterotoxinen, die in kleinsten Mengen enterotoxische und allgemeine Wirkungen entfalten können, nicht ausgeschlossen werden.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestimmungen des Bakterientiters wurden sowohl quantitative als auch semi-quantitative Methoden angewandt. Dabei erwies sich die semi-quantitative Uricult-Methode als gleichwertig. Da sie in der Praxis wesentlich leichter durchführbar ist und innerhalb relativ kurzer Zeit (15 - 24 h) Aufschluß über potentiell bedenkliche Kontaminationen von MM- bzw. Colostrum-Proben gibt, sollte ihr für routinemäßige quantitative bakteriologische Analysen der Vorzug gegeben werden. Dies bestätigen auch andere Autoren(11, 42, 81, 87), die dieses Verfahren schon routinemäßig anwenden. Ein Nachteil der Uricult-Methode ist, daß eine Unterscheidung zwischen *Staph. epidermidis* und *Staph. aureus* nicht möglich ist und deshalb zusätzlich der Koagulase-Test angewendet werden muß. L. Hohenauer (1980), W. Minder et al. (1982) und V. Antila et al. (1976) berichten über gute Erfahrungen bei der routinemäßigen Anwendung von Verfahren wie Lactocult (Orion) und Urotube (Roche), die nach dem gleichen Prinzip verfahren (3, 43, 60). Faßt man die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen und qualitativen bakteriologischen Untersuchungen unter dem Gesichtspunkt zusammen, daß alle MM-Proben mit einem Bakterientiter $> 10^5$ Keime/ml sowie jede Kontamination der MM-Proben und potentiell pathogenen Keimen (gramnegative Enterobakterien, *Staph. aureus*) als bakteriologisch bedenklich angesehen werden, so zeigt sich, daß von den 42 untersuchten Colostrum- und Muttermilchproben 17 % in einer für die Gesundheit des Säuglings bedrohlichen Weise kontaminiert sind. Schlüsselt man dieses Ergebnis jedoch danach auf, ob die entsprechenden Milchproben mit oder ohne Anleitung gewonnen wurden, so zeigt sich, daß die sorgfältige

Einhaltung steriler Bedingungen die Gefahr bakterieller Kontamination deutlich erniedrigen kann. Während von den 10 ohne Anleitung gewonnenen Proben 40 % als bakteriologisch bedenklich bezeichnet werden müssen, trifft dies nur auf 6 % der unter Anleitung gewonnenen Proben zu. Andere Autoren berichten über ähnliche Erfahrungen (11, 19, 42, 44, 87).

Wie die vorgelegten Ergebnisse gezeigt haben, kommt es zu keinen nennenswerten Veränderungen des Keimgehalts in den Milchproben, wenn diese sofort untersucht oder bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -18°C gelagert werden. So blieb der Keimgehalt der Muttermilch- und Colostrumproben bei 28tägiger Lagerung bei -18°C konstant. Demgegenüber kam es bei $+4^{\circ}\text{C}$ Lagerung zu einer leichten Reduktion des Bakteriengehaltes, die allerdings ohne Relevanz für die Praxis ist. Die Konstanz des Keimgehalts bestätigen auch andere Autoren (6, 10, 37, 60, 81, 97). Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ wirkt sich auf gramnegative Bakterien offensichtlich ähnlich aus, wie die Untersuchungen mit *E. coli* kontaminierten MM-Proben zeigten. Auch hier kam es zu einer leichten Reduktion des *E. coli*-Titers, die in etwa der Reduktion des *Staph. epidermidis*-Titers entsprach. Dagegen nimmt der *E. coli*-Titer durch Tieffrieren deutlich ab, während die Konzentration an *Staph. epidermidis* konstant bleibt. Möglicherweise sind die gramnegativen Keime durch die, im Gegensatz zu grampositiven Keimen, anders aufgebaute Zellwand empfindlicher gegen tiefe Temperaturen.

Generell läßt sich jedoch sagen, daß es keine wesentlichen Unterschiede im Verhalten grampositiver und gramnegativer Keime unter den gegebenen Lagerungsbedingungen gibt. Festzuhalten bleibt, daß in keinem Fall eine Vermehrung der Keimzahl während der Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ über 72 h bzw. -18°C über 28 Tage beobachtet werden konnte, was auch Björkstén et al. (1980) herausgefunden haben.

Meine Untersuchungen konnten keinen Anhaltspunkt dafür liefern, daß sich bakterielle Kontamination negativ auf die infektionsverhütenden Schutzfaktoren der MM auswirkt. Beimpfung von MM-Proben mit *E. coli* führte weder zu einer Reduktion des Leukozytengehalts noch des Immunglobulingehalts verglichen mit den entsprechenden unbeimpften MM-Proben unter gleichen Lagerungsbedingungen. Die Gefahren, die von bakterieller Kontamination ausgehen, liegen also ausschließlich in Qualität und Quantität der Keime selbst begründet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier untersuchten Lagerungsbedingungen die immunprotektiven Eigenschaften der MM in wesentlich höherem Maße bewahren als Verfahren, die mit Pasteurisieren oder Abkochen einhergehen. Für einen Zeitraum von 72 h stellt die Lagerung der MM bzw. Colostrum bei $+4^{\circ}\text{C}$ die beste Methode dar und ist einer Lagerung bei -18°C vorzuziehen, da bei $+4^{\circ}\text{C}$ ein großer Teil der in der Milch vorhandenen Leukozyten vital erhalten bleibt. Soll die Milch jedoch über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, dann sollte sie tiefgefroren werden. Diese Meinung vertreten auch andere Autoren (10, 39, 60).

Auch unter bakteriologischen Gesichtspunkten scheinen sich diese Lagerungsbedingungen gut vertreten zu lassen. So hat sich gezeigt, daß es zu keiner Vermehrung der in der MM bzw. Colostrum vorhandenen Keime in den untersuchten Zeiträumen kommt und daß eine gefährliche nachträgliche Kontamination äußerst unwahrscheinlich ist. Aus bakteriologischer Sicht ist das Hauptproblem in der Ausgangskontamination der MM-Proben, die bei der Gewinnung der Proben entsteht, zu sehen. Hier hat sich bestätigt, wie wichtig es ist, die Mütter darüber aufzuklären, daß sie bei der Milchgewinnung besondere Sorgfalt anwenden.

Durch entsprechende Abpumptchnik, ausschließliche Verwendung steriler Gefäße, die möglichst die Klinik zur Verfügung stellen sollte und gründliche Reinigung der Brust und Hände kann die Keimzahl stark reduziert werden (4, 11, 38, 43, 44, 52, 61, 102).

Zusätzlich sollte die Milch durch routinemäßige bakteriologische Kontrollen überprüft werden, da auch große Sorgfalt nicht immer verhindert, daß bisweilen pathogene Keime in die Milchproben geraten. Zudem ist das Auftreten von pathogenen Keimen in nativer Frauenmilch unabhängig vom Bakterientiter, d. h. MM-Proben mit niedrigen Keimzahlen können durchaus pathogene Keime enthalten (39).

Unter diesen Voraussetzungen sind die hier untersuchten Lagerungsbedingungen geeigneter zur Aufbewahrung von Muttermilch bzw. Colostrum als Methoden, die eine Hitzebehandlung mit einbeziehen.

V. Zusammenfassung

Bei der Ernährung von Frühgeborenen und kranken jungen Säuglingen ergibt sich immer wieder die Notwendigkeit, Muttermilch zu Hause abzupumpen, um sie später dem im Krankenhaus befindlichen Kind zu füttern. Deshalb wurde noch einmal sorgfältig der Einfluß verschiedener Lagerungstemperaturen ($+4^{\circ}\text{C}$ und -18°C) auf die immunprotektiven Eigenschaften und den Bakteriengehalt aus 12 Colostrum- und 30 Muttermilchproben untersucht. Dabei wurden folgende Methoden angewendet: Die Leukozyten wurden mit einer Bürker-Türk-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt, die Zellaktivität wurde mit der Trypanblauausschlußmethode bestimmt. Der Gehalt an IgA, IgM und IgG wurde mittels radialer Immundiffusion ermittelt. Die Keimzahlbestimmung aus der Milch erfolgte quantitativ durch Plattenausspaltungsverfahren und semiquantitativ unter Verwendung des Uricult-Verfahrens. Außerdem wurden 14 Muttermilchproben zusätzlich mit *E. coli* (ATCC 25 922) beimpft, um das Verhalten potentiell pathogener Keime bei diesen Lagerungsbedingungen und deren Auswirkung auf den Leukozyten- und Immunglobulingehalt der Muttermilch zu untersuchen.

Während 72 Stunden langer Aufbewahrung bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank blieb sowohl die Zahl vitaler Leukozyten als auch der Immunglobulingehalt der Milchproben weitgehend konstant. Dagegen verloren beim Tieffrieren die meisten Leukozyten ihre Vitalitätszeichen. Der Immunglobulingehalt hingegen blieb auch bei den tiefen Temperaturen praktisch konstant. Es kam weder bei $+4^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 72 Stunden noch bei -18°C innerhalb von 28 Tagen zu einer Vermehrung der wenigen in der Muttermilch bzw. dem Colostrum vorhandenen "Primär-Keime". Auch konnten keine nachträglichen bakteriellen Kontaminationen festgestellt werden. Die artifizielle Kontamination der Muttermilch mit *E. coli*

wies nach den obengenannten Lagerungsbedingungen die ursprünglich eingebrachte Bakterienzahl auf und hatte keinerlei Einfluß auf den Leukozyten- und Immunglobulingehalt der Muttermilch.

Es zeigt sich, daß der Bakteriengehalt frisch gewonnener Milchproben eindeutig von der Gewissenhaftigkeit, mit der antiseptische Bedingungen bei der Milchgewinnung eingehalten wurden, abhing. Bei entsprechender Sorgfalt lassen sich Milchproben gewinnen, deren Keimgehalt als unbedenklich angesehen werden kann. Es ist bekannt, daß eine Hitzebehandlung von Muttermilch zu einem fast vollständigen Verlust der immunprotektiven Eigenschaften führt. Vergleicht man damit die von mir untersuchten Lagerungsbedingungen, so wird klar, daß letztere dem Anspruch, die immunologischen Schutzfaktoren der Milch zu erhalten und gleichzeitig bedenkliche bakterielle Kontamination zu vermeiden, besser gerecht werden als Kochen, Pasteurisieren oder Uperisieren. Auf routinemäßige bakteriologische Kontrollen sollte allerdings nicht verzichtet werden. Für eine kurzfristige Aufbewahrung von Colostrum und Muttermilch ist die ununterbrochene Aufbewahrung im Kühlschrank bei $+4^{\circ}$ als optimal anzusehen.

Muß die Milch längere Zeit aufbewahrt werden, so ist rasches Einfrieren und Aufbewahren im Gefrierfach zu empfehlen. Der Verlust der Leukozytenfunktion muß dann allerdings in Kauf genommen werden.

Ähnlich wie bei der Aufbewahrung anderer verderblicher Lebensmittel sollte die Kühlkette möglichst nicht unterbrochen werden, und die Milch sollte nicht mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden. Für den Transport aus der Wohnung ins Krankenhaus empfiehlt sich der Gebrauch von Kühltaschen.

Literaturverzeichnis

1. Ahlstedt S., B. Carlsson, L. A. Hanson and R. M. Goldblum
Antibody Production by Human Colostral Cells
Scand. J. Immunol. 4, 535 - 539, 1975
2. Amman A. J. and E. R. Stiehm
Immune Globulin Levels in Colostrum and Breast Milk,
and Serum from Formula-and Breast-Fed Newborns
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122:1098, 1966
3. Antila v. und Aöl. Kylä-Siuvola
Die Bestimmung der Milchqualität mit der Lactocult-
Methode
Milchwissenschaft 31, 8-12, 1976
4. Asquith M. T. and J. R. Harrod, M. D.
Reduction of bacterial contamination in banked human milk
J. Pediatr., 95, 993-4, 1979
5. Atkinson S. A., Bryan M. H., and Anderson G. H.
Human milk: Difference in nitrogen concentration in milk
from mothers of term an premature infants
J. Pediatr. 93, 67-69, 1978
6. Banner N. und Heine W. (Hrsg.)
Bericht über das Symposium zur Frauenmilch-Konservierung
vom 18. - 21. Main 1981 in Hradec Králové (CSSR)
Kinderärztl. Prax. Heft 2, 94-6, 1982
7. Bargmann W.
Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
6. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart 1969, S. 9

8. Baumann U.
Motivation, Technik und Resultate des Stillens
Therapeutische Umschau, 35, 603-9, 1978
9. Bhaskaram P. and Reddy V.
Bactericidal activity of human milk leucocytes
Acta Paediatr. Scand. 70 : 87-90. 1981
10. Björkstén B., Burman L. G., De Chateau P., Fredrikzon B.,
Gothefors L., Hernell O.
Collecting and banking human milk: to heat or not to heat?
Br. Med. J., 281, 765-9, 1980
11. Braun O. H.
Über die infektionsverhütende Wirkung der Muttermilch
und deren mögliche Ursachen
Klin. Pädiat. 188, 297-310, 1976
12. Braun O. H., A. Tolle und H. Wiesner
Die Bakteriologie der Frauenmilch und ihre Bedeutung
für die Verfütterung an Frühgeborene
Internationales Symposium "Stillen und Stillhindernisse"
Düsseldorf 1979, Schmidt E. (Hrsg.)
Deutsches Grünes Kreuz Marburg/Lahn, S. 99-108, 1979
13. Brunn Sylvia u. Schmidt Eberhard
Die Kunst des Stillens
Lector Verlag GmbH, Altendorf, 1979
14. Carrol L., Osman M., Davies D. P., Mc Neish A. S.
Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk
to babies on neonatal units
Lancet, 2, 732-3, 1979

15. Chandan R. C., Shahani K. M. and Holly R. G.
Lysozym Content of Human Milk
Nature, 204, 76-7, 1964
16. Cress C. and Paxon C. L.
Breast milk macrophages
Pediatr. Res., 11, 485, 1977
17. Cruz, J. R., Garcia C. B. Gebre-Medhin M., Hofrander Y,
Urrutia and L. A. Hanson
Studies on Human Milk III. Secretory IgA
Quantity and Antibody Levels against Escherichia coli in
Colostrum and Milk from Underprivileged and Privileged
Mothers
Pediatr. Res. 16 : 272-276 (1982)
18. Cunningham A. S.
Morbidity in breast-fed and artificially fed infants
J. Pediatr. 90, 726-9, 1977
19. Davidson D. C., Poll R. A. and Roberts C.
Bacteriological monitoring of unheated human milk
Arch. Dis. Child. 54, 760-764, 1979
20. Davis D. P.
Adequacy of expressed breast milk for early growth of
preterm infants
Arch. Dis. Child., 52, 296-301, 1977
21. Davies D. P. and Evans T. J.
Nutrition and early growth of preterm infants
Early Hum. Dev. 1978, 2, 383-92

22. Downham M. A. P. S., Scott R., Sims D. G., Webb J. K. G.
and Gardner P. S.
Breast-feeding protects against respiratory syncytial
virus infections
Br. Med. J. 2, 274-276, 1976
23. Eidelmann A. I. and Szilagyi G.
Patterns of bacterial colonization of human milk
Obstetrics and Gynecology 53, 550-552, 1979
24. Emödi G. and Just M.
Interferon Production by Lymphocytes in Human Milk
Scand. J. Immunol. 3, 157-160, 1974
25. Evans T. J., Ryley H. C., Neale L. M., Dodge J. A.
and Lewarne V. M.
Effect of storage and heat on antimicrobial proteins
in human milk
Arch. Dis. Child. 53, 239-241, 1978
26. Fallot M. E., Boyd J. L. and Oski F. A.
Breast-feeding reduced incidence of hospital admissions
for infections in infants
Pediatr. 65, 1121-1124, 1980
27. Ford J. E., Law B. A., Marshall V. M. E. and Reiter B.
Influence of the heat treatment of human milk on some
of its protective constituents
J. Pediatr. 90, 29-35, 1977
28. France G. L., Marmer D. J. and Steele R. W.
Breast-feeding and Salmonella Infection
Am. J. Dis. Child. 134, 147-152, 1980

29. Frank K. und Dobias Gy.
Veränderungen der Immunstoffe der Muttermilch durch
Wärmeeinwirkung
Kinderärztliche Praxis, Heft 2, 71-76, 1978

30. Gibbs J. H., Fisher C., Bhattacharya S., Goddard P.
and Baum J. D.
Drip breast milk: its composition, collection and
pasteurization
Early Hum. Dev., 1, 227-245, 1977

31. Goldblum R. M., Goldman A. S., Garza C., Johnson C. A.
and Nichols B. L.
Human milk banking II. Relative stability of immunologic
factors in stored colostrum
Acta Paediatr. Scand. 71 : 143-144, 1982

32. Goldman A. S., Garza C., Nichols B. L. and Goldblum R. M.
Immunologic factors in human milk during the first year
of lactation
J. Pediatr. 100, 563-567, 1982

33. Goldman A. S. and Smith C. W.
Host resistance factors in human milk
J. Pediatr. 82, 1082-1090, 1973

34. Greenbaum Blumen D.
Maternal-Infant Bonding
in International Congress Series No 518
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the International Symposium on
Breast Feeding, Tel-Aviv, 1980
Edited by: S. Freier and A. I. Eidelman pp. 277-282

35. Gross S. J., Buckley R. H., Wakil S. S., Mc Allister D. C.
David R. J. and Faix R. G.
Elevated IgA concentration in milk produced by mothers
delivered of preterm infants
J. Pediatr. 99, 389-393, 1981
36. Gross S. J., David R. J., Bauman L. and Tomarelli R. M.
Nutritional composition of milk produced by mothers
delivering preterm
J. Pediatr. 96, 641-644, 1980
37. Hack M., Boxerbaum B. and Fanaroff A.
Fresh Human Milk: Bacterial Flora in Urban U. S. Mothers
Pediatr. Res. (Abstr.) 9, 304, 1975
38. Hanson L. A. and Winberg J.
Breast milk and defence against infection in the Newborn
Arch. Dis. Child. 47, 845-848, 1972
39. Hernandez J., Lemons P., Lemons J. and Todd J.
Effect of storage processes on the bacterial growth
inhibiting activity of human milk
Pediatrics, 63, 597-601, 1979
40. Ho F. C. S., Wong R. L. C. and Lawton J. W. M.
Human colostral and breast milk cells
Acta Paediatr. Scand. 68 : 389-396, 1979
41. Ho P. C. and Lawton J. W. M.
Human colostral cells: Phagocytosis and killing of E.
coli and C. albicans
J. Pediatr. 93, 910-915, 1978

42. Hohenauer L.
Stillen und Frauenmilchernährung im Kinderkrankenhaus
in Internationales Symposium "Stillen und Stillhinder-
nisse", Düsseldorf 1979, Schmidt E. (Hrsg.)
Deutsches Grünes Kreuz, Marburg/Lahn, S. 123-129, 1979
43. Hohenauer L.
Routinemäßige Anwendung von Lactocult bei der bakteriolo-
gischen Schnelltestung von Frauenmilch
Wien. Med. Wochenschr. 130, 560-2, 1980
44. Hohenauer L.
Zur Ernährung von Frühgeborenen mit Geburtsgewichten
unter 1500g mit roher Frauenmilch
Wien. Med. Wochenschr. 92, 53-57, 1980
45. Houston M. J., Howie P. W., Smart L., Mc Ardle T.
and Mc Neilly A. S.
Factors affecting the duration of breast feeding:
2. Early feeding practices and social class
Early Hum. Dev. 8, 55-63, 1983
46. Jelliffe D. B., Jelliffe EFP: Human Milk in the Modern
World
London, Oxford University Press, 1977
47. Johnson D. F., France G. L., Marmer D. J. and Steele R.W.
Bactericidal Mechanismus of Human Breast Milk Leucocytes
Infection and Immunity, 28, 314-318, 1980
48. Klaus M. N., Kenell J. H., Plumb N. and Zuehlke
Human maternal behavior at first contact with her young
Pediatrics 46: 187-192, 1970

49. Larsen S. A. and Homer D. R.
Relation of breast versus bottle feeding to hospitalisation for gastroenteritis in a middle class U.S. population
J. Pediatr., 92, 417-418, 1978
50. Lawton J. W. M. and Shortridge K. F.
Protective factors in human breast milk and colostrum
Lancet 1, 253, 1977
51. Liebhaber M., Lewiston N. J., Asquith M. T., Olds-Arroyo L. and Sunshine P.
Alternations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing
J. Pediatr. 91, 897-900, 1977
52. Liebhaber M., Lewiston N. J., Asquith M. T. and Sunshine P.
Comparison of bacterial contamination with two methods of human milk collection
J. Pediatr. 92, 236-237, 1978
53. Mandyla H., Xanthos M., Baum J. B. and Matsaniotis N.
Changes of human milk leucocytes during feeding time, pasteurisation and various processes of storing it
Neonatal. Intensive care Meeting, Canada Ag. 1981
54. Martinez G. A. and Dodd D. A.
1981 Milk Feeding Patterns in the United States
During the First 12 Months of Life
Pediatrics 71, 166-170, 1983
55. Mata L. J. and Wyatt R. G.
Host resistance to infection
The American Journal of Clinical Nutrition:
24, 976-986, 1971

56. Matthew D. J., Taylor B., Norman A. P., Turner M. W.
and Soothill J. F.
Prevention of Eczema
Lancet, 2, 321-324, 1977
57. Matthews T. H. J., Naiv C. D. G., Lawrence M. K. and
Tyrrell D. A. J.
Antiviral activity in milk of possible clinical importance
Lancet 2, 1387-9, 1976
58. McClelland D. B. L., Mc Grath J. and Samson R. R.
Antimicrobial Factors in Human Milk
Acta Paediatr. Scand. Suppl. 271, 1-20, 1978
59. Michael J. G., Ringenback R. and Hottenstein S.
The Antimicrobial Activity of Human Colostral
Antibody in the Newborn
J. Infect. Dis. 124, 445-448, 1971
60. Minder W. Roten H., Zurbrügg R. P., Gehrig G. Lebek G.,
Nagel G.
Quality of breast milk: its control and preservation
Helv. paediatr. Acta 37, 115-137, 1982
61. Mogilner B. M., Miskin A., Shain H., Shlomo M. and Nudel E.
Contamination of mechanically expressed human milk
in International Congress Series No 518
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the International Symposium on
Breast Feeding, Tel-Aviv, 1980
Edited by: S. Freier and A. I. Eidelman pp 277-282

62. Mohr J. A., Leu R. and Mabry W.
Colostrual Leukocytes
J. of Surgical Oncology 2, 163-167, 1970
63. Moriartey R. R., Finer N. N., Cox S. F., Phillips H. J.,
Theman A., Stewart A. R. and Ulan O. A.
Necrotizing enterocolitis and human milk
J. Pediatr. 94, 295-6, 1979
64. Narayanan I., Prakash K., Bala S., Verma R. K. and
Gujral V. V.
Partial supplementation with expressed breast.milk for
Prevention of Infection in low-birth-weight infants
Lancet 2, 561-563, 1980
65. Narayanan I., Prakash K. and Gurrall V. V.
The value of human milk in the prevention of infection
in the high-risk low-birth-weight infant
J. Pediatr. 99, 496-498, 1981
66. Noren K.
Levels of organochlorine contaminants in human milk in
relation to the dietary habits of the mother
Acta Paediatr. Scand. 72 : 811-816, 1983
67. Ogra P. L., Fishant M. and Theodore Ch.
Immunology of breast milk: maternal neonatal interactions
in International Congress Series No 518
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the Internation. Symposium on
Breast Feeding, Tel-Aviv, 1980
Edited by: S. Freier and A. I. Eiderman S. 115-117

68. Ogra S. S. and Ogra P. L.
Immunologic aspects of human colostrum and milk (I)
J. Pediatr. 92, 546-549, 1978
69. Ogra S. S. and Ogra P. L.
Immunologic aspects of human colostrum and milk (II)
J. Pediatr. 92, 550-555, 1978
70. Ogra S. S., Weintraub D. and Ogra P. L.
Immunologic aspects of human colostrum and milk (III)
J. of Immunology, 119, 245-8, 1977
71. Praxon Ch. L., Cress C. C.
Survival of human milk leukocytes
J. Pediatr. 94, 61-64, 1979
72. Peiterson B., Bohn L. and Anderson H.
Quantitativ determination of immunoglobulius, lysozym
and certainelectrolytes in breast milk during the entire
period of lactation, during a 24-hour period, and in milk
from the individual mammary gland
Acta Paediatr. Scand 64 : 709-717, 1975
73. Pitt J.
The milk mononuclear phagocyte
Pediatrics, 64, 2 Suppl., 745-9, 1979
74. Pitt J., Barlow B. and Heird W. C.
Protection against experimental necrotizing enterocolitis
by maternal Milk. I. Role of milk leukocytes
Pediatr. Res. 11 : 906-909, 1977

75. Pittard W. B.
Breast milk immunology
Am. J. Dis. Child. 133, 83-87, 1979
76. Pittard W. B. and Bill K.
Human Milk Banking: Effect of Refrigeration on Cellular
Comonents
Clinical Pediatrics 20, 31-33, 1981
77. Raptopoulou-Gigi, Marwick K. McClelland D. B. L.
Antimicrobial proteins in sterilised human milk
Med. J. 1. 12-14, 1977
78. Reddy V., Bhaskaram C., Raghuramulu and Jagadeesan V.
Antimicrobial factors in human milk
Acta Paediatr. Scand 66 : 229-232, 1977
79. Rogers H. J. and Syuge C.
Bacteriostatic effect of human milk on Escherichia coli:
the role of IgA
Immunology 34, 19-28, 1978
80. Rossi E.
Die natürliche und künstliche Ernährung des Säuglings
Monatsschr. Kinderheilkd., 128, 161-165, 1980
81. Roten H., Minder W. und Zurbrügg R. P.
Zur Qualitätskontrolle und Haltbarkeit der Muttermilch
Therapeutische Umschau, 35, 619-620, 1978
82. Salariya E. M., Easton P. M. and Cater J. T.
Duration of breast-feeding after early initiation and
frequent feeding
Lancet 2, 1141-3, 1978

83. Schauler R. J. and Oh W.
Composition of breast milk obtained from mothers of
premature infants as compared to breast milk obtained
from douors
J. of Pediatr. 96, 4, 679-681, 1980
84. Schetelig H.
Bedeutung des Stillens in der Ernährung des Säuglings
Fortschr. Med. 97, 349-352, 1979
85. Schlesinger J. J. and Covelli H. D.
Evidence for transmission of lymphocyte responses to
tuberculin by breast-feeding
Lancet 2, 529-532, 1977
86. Schmidt E.
Vorzüge der Muttermilchernährung des Säuglings
Monatsschr. Kinderheilkd. 127, 525-528, 1979
87. Schwarz R. und Braun O. H.
Über die Ernährung von Früh- und Neugeborenen mit
nativer Muttermilch
Monatsschr. Kinderheilkd. 131, 497-501, 1983
88. Soothill J. F.
The role of mothers milk in prevention of allergy
in International Congress Series no 518
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the International Symposium on
Breast-Feeding, Tel-Aviv, 1980
Edited by: S. Freier u. A. I. Eiderman S. 132-136

89. Sørensen, S. P. L. *Biochem. Z.*, 22, 352, 1909
90. Stephens S., Dolby J. M., Montreuil J. and Spik G.
Differences in inhibition of the growth of commensal
and enteropathogenic strains of *Escherichia coli* by
lactotransferrin and secretory immunoglobulin A isolated
from human milk
Immunology 41, 597-603, 1980
91. Stoliar O. A., Pelley R. P., Kaniecke-Green E.,
Klaus M. H. and Carpenter C. C. J.
Secretory IgA against Enterotoxins in Breast Milk
Lancet, 1, 1258-1261, 1976
92. Sunshine Philipe, Asquith M. T. and Liebhaber M.
The effects of collection and processing on various
components of human milk
in *International Congress Series No 518*
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the International Symposium
on Breast-Feeding
Edited by: S. Freier u. A. I. Eidelman S. 187-190
93. Susuki S., Lucas P. J. and Coombs R. R. A.
Immunoglobulin concentration and bacterial antibody
titres in breast milk from mothers of preterm and
term infants
Acta Paediatr. Scand. 72 : 671-677, 1983
94. Tamminen T., Verronen P., Saarikoski S. Göransson A.
and Tuomiranta N.
The influence of perinatal factors on breast feeding
Acta Paediatr. Scand 72 : 9-12, 1983

95. Tönz O.
Ernährungsphysiologische und immunologische Vorzüge
der Frauenmilchernährung
Therapeutische Umschau, 35, 610-618, 1978
96. Valman H. B.
Psychological aspects of breast feeding
in International Congress Series No 518
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the International Symposium
on Breast-Feeding
Edited by: S. Freier u. A. I. Eidelman
97. Welsh J. K. and May J. T.
Anti-infective properties of breast milk
J. Pediatr. 94, 1-9, 1979
98. Widdowson E. M.
Protective properties of human milk and the effects
of processing on them
Arch. Dis. Child. 53, 684-686, 1978
99. Willianson S., Hewi H. J. H., Finuance E., Gamsu H. R.
Organisation of bank of raw and pasteurised human
milk for neonatal intensive care
Br. Med. J. 1, 393-396, 1978
100. Winberg J., Wahlberg V. and Chateau P.
Breast feeding - early initiation and duration an
epidemiological study
in International Congress Series No 518
Human milk, its biological and social value
Selected papers from the International Symposium
on Breast-Feeding
Edited by: S. Freier and A. I. Eidelmann

101. Winberg J., Wessner G.

Does breast milk protect against septicaemia in the newborn?

Lancet 1, 1091-1094, 1971

102. Yamanouchi J. and Igarshi J.

Storage of frozen mother's milk in premature nursery in International Congress Series No 518

Human Milk, its biological and social value selected papers from the International Symposium on Breast-Feeding, Tel-Aviv, 1980

Edited by: S. Freier and A. I. Eiderman

103. The how of breast milk and infection (editional)

Lancet 1, 1192-3, 1981

Literatur zum Historischen Teil

- (1) Das Kaiserin Auguste Victoria Haus zur Bekämpfung der Säuglingssterblichkeit im Deutschen Reich
von E. Dietrich Geh. Obermedizinalrat in Berlin
Separat Abdruck aus der Festschrift zum XIV. Internationalen Kongreß für Hygiene und Demographie,
Berlin 1907, Jena, Verlag von Gustav Fischer 1907
- (2) Eröffnungsrede
des Kaiserin Auguste Victoria Hauses in Berlin (1909)
- (3) E. Thomas
Zur Biologie der Colostrumkörperchen
Zeitschrift für Kinderheilkunde
Sonderabdruck aus Band VII, Heft 4, 1913
- (4) H. Langer
Die Bedeutung der initialen Frauenmilchernährung für
den Schutz vor Verdauungsstörungen
Sonderabdruck aus der Zeitschrift für Kinderheilkunde
O. XXVI (1920)
- (5) A. Ylppö
Zur Physiologie, Klinik und Schicksal der Frühgeborenen
Zeitschrift für Kinderheilkunde
Sonderabdruck aus Band XXIV, Heft 14, 1919
- (6) Langstein, Rott, Edelstein
Der Nährwert des Colostrums, Heubner Festschrift,
Verlag Julius Springer Berlin 1913
- (7) Birk
Die Bedeutung des Colostrums
Monatsschrift für Kinderheilkunde 9, 599, 1911

- (8) L. Langstein u. L. Landé
Pathologie der Neugeburtsperiode
Berlin Charlottenburg
Sonderabdruck aus dem Handbuch für Kinderheilkunde
von Prof. D. M Pfandler (München)
3. Aufl. 1. Band (1923) Verlag F. C. Vogel Leipzig
- (9) L. Langstein
Frauenmilch bei Erkrankungen jenseits des Säuglings-
alters
Sonderabdruck aus "Therapeutische Monatshefte"
März 1917
- (10) Deutschlands Spende für Säuglings- und
Kleinkinderschutz (1916)
Denkschrift 22. Oktober 1916
Seine Majestät der Kaiser an Ihre Majestät die Kaiserin
- (11) C. S. Engel
Sonderabdruck aus der "Zeitschrift für Fleisch-
und Milchhygiene"
14. Jahrgang 1904, Nr. 12, Berlin
Zur Beschaffung billiger Säuglingsmilch in den
Städten Preußens
- (12) Festansprache anlässlich des 30jährigen Bestehens des
Kaiserin Auguste Victoria Hauses gehalten vom ärzt-
lichen Leiter Dozent Dr. med. habil. Kurt Hofmeier
5. Juni 1939
- (13) L. Langstein
Wie ist die Bevölkerung über Säuglingspflege und
Säuglingsernährung zu belehren?
Berlin, Verlag von Julius Springer, 1911

- (14) L. Langstein
Ernährung und Pflege des Säuglings
Berlin, Verlag von Julius Springer, 8. Auflage, 1923
- (15) F. Rott
Umfang, Bedeutung und Ergebnisse der Unterstützungen
an stillende Mütter
Veröffentlichungen aus dem Gebiete der Medizinalver-
waltung Berlin, 1914,
Verlagsbuchhandlung von Richard Scholtz
- (16) Sonderabdruck aus BII
F. Rott: Geburtenhäufigkeit, Säuglingssterblichkeit
und Säuglingsschutz in den ersten beiden Kriegsjahren
Berlin, Verlag von Julius Springer, 1917
- (17) G. Schmalfuss (Ammenarzt in Hamburg)
Stellung und Aufgaben des Ammenuntersuchungsarztes
Jena, Verlag von Gustav Fischer
- (18) Sonderabdruck aus der Zeitschrift für Säuglingsschutz
Behr-Pinnow, L. Langstein
Berlin, Verlag von Georg Stilke (1915)
- (19) L. Langstein
Entwicklung, Erfahrungen und praktische Arbeit des
Kaiserin Auguste Victoria Hauses zur Bekämpfung der
Säuglingssterblichkeit im Deutschen Reiche
Sonderabdruck aus der Berliner Klin. Wochenschrift,
1915, Nr. 20 und 21
- (20) Sonnenberger
Über Ziegenmilch als Kindernahrungsmittel
Sonderabdruck aus der Berliner klin. Wochenschrift
1916, Nr. 23

- (21) L. Langstein
Ernährungs- und Erziehungsfehler im Kindesalter
Blätter für Volksgesundheitspflege
Gemeinverständliche Zeitschrift 15. Jahrgang
Heft 5, Mai 1915
- (22) Adalbert Reiche: Das neugeborene Kind. Seine physiologischen Schwächezustände, seine natürliche Ernährung und die bei derselben entstehenden Schwierigkeiten, Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde (Sonderabdruck aus Band XV)
Berlin Verlag Julius Springer 1917
- (23) F. Rott
Sonderabdruck aus der Monatsschrift öffentliche Gesundheitspflege
Verlag Friedr. Vieweg und Sohn in Braunschweig
- (24) F. Rott
Beiheft der Zeitschrift für Säuglingsschutz
April 1912
Konferenz über die Verwendbarkeit der Ziegenmilch als Säuglingsnahrung anstelle von Kuhmilch im Kaiserin Auguste Victoria Haus
Verlag Georg Stilke in Berlin NW 7

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. L. Ballowitz danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas sowie ihre Geduld bei der Anleitung und der Durchsicht der Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Chahin für ihre Unterstützung während der praktischen Durchführung meiner Versuche und bei Herrn Wegscheider, der mich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse beraten hat.

Meinen besonderen Dank richte ich auch an alle Frauen, die mir für meine Versuchsreihen Proben ihrer Muttermilch zur Verfügung stellten.

Lebenslauf

geboren am	Beate Kellndorfer 14.10.1953 in Burghausen/Kreis Altötting als älteste Tochter von Hans Kellndorfer und Helga Kellndorfer geb. Scholle
1960 - 1964	Besuch der St. Anna-Volksschule, München
1964 - 1968	Übertritt in das St. Anna-Gymnasium, München
1968	Wechsel in das Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger, München
Juni 1973	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife im Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger, München
1973 - 1978	Studium der Chemie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
April 1976	Ablegung der Diplomvorprüfung für Studierende der Chemie an der LMU, München
ab März 1978	Studium der Medizin an der Freien Universität, Berlin
1983 - 1984	Praktisches Jahr in der Chirurgischen Abteilung des Klinikum Charlottenburg, der II. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Moabit und in der Universitätskinderklinik Kaiserin Auguste Victoria Haus
Mai 1984	Approbation als Arzt

